



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE MOLECOLARI E BIOMOLECOLARI**

**Dottorato in Biologia Cellulare e dello Sviluppo**

**ANALISI FUNZIONALE DI GENI REGOLATORI  
DELLO SVILUPPO EMBRIONALE  
DI *PARACENTROTUS LIVIDUS***

SSD: BIO/11

**TESI DI  
ROSA GUARCELLO**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO  
PROF.SSA GABRIELLA SCONZO**

**TUTOR  
PROF. GIOVANNI SPINELLI**

**CO-TUTOR  
DOTT. VINCENZO CAVALIERI**

XXIII CICLO – 2009-2011

---

DOTTORATO



# INDICE

<b>Abstract (Inglese).....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>Abstract (Italiano).....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>Prefazione .....</b>	<b>- 4 -</b>
Il riccio di mare come modello sperimentale.....	- 4 -
<b>Introduzione .....</b>	<b>- 5 -</b>
1.1 Sviluppo del riccio di mare: fasi fondamentali.....	- 5 -
1.2 Sviluppo del riccio di mare: basi molecolari .....	- 10 -
1.2.1 Networks di geni regolatori dello sviluppo.....	- 10 -
1.2.2 Il network di geni regolatori del differenziamento endomesodermico e la specificazione lungo l'asse animale/vegetativo.....	- 11 -
1.2.3 Il network di geni regolatori del differenziamento ectodermico e la specificazione dell'asse orale/aborale.....	- 16 -
1.3 La scheletogenesi del riccio di mare: eventi morfogenetici e basi molecolari ....	- 23 -
1.3.1 Morfogenesi scheletrica .....	- 23 -
1.3.2 Il network dei geni regolatori del differenziamento scheletogenico: struttura e considerazioni evolutive.....	- 24 -
1.3.3 Regolazione della morfogenesi scheletrica da parte di segnali di origine ectodermica .....	- 29 -
1.4 Le proteine TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox- <i>Coiled coil</i> ) e i loro ruoli durante l'embriogenesi .....	- 32 -
<b>Scopo del lavoro .....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>Risultati.....</b>	<b>- 39 -</b>
2.1 Struttura genomica del locus <i>strim-1</i> .....	- 39 -
2.2 Clonaggio e analisi di sequenza del cDNA codificante per Strim1 .....	- 41 -
2.3 Il complemento di geni contenenti trim box in <i>S. purpuratus</i> .....	- 42 -
2.4 L'analisi comparativa rivela siti di legame per fattori di trascrizione conservati tra i promotori dei geni contenenti trim box in <i>S. purpuratus</i> .....	- 49 -

2.5 Analisi dell'apparato di <i>cis</i> -regolazione del gene <i>strim1</i> .....	50 -
2.6 Il promotore delle due copie del gene <i>strim1</i> contiene l'elemento trasponibile <i>Helitron-N2</i> .....	52 -
2.7 <i>strim1</i> è caratterizzato da due fasi di espressione durante lo sviluppo embrionale....	53 -
2.8 I trascritti di <i>strim1</i> presentano un profilo di localizzazione spaziale ristretto a cellule dell'ectoderma orale .....	55 -
2.9 L'espressione ectopica di <i>strim1</i> altera la morfogenesi scheletrica.....	57 -
2.9.1 L'espressione ectopica di <i>strim1</i> determina un aumento del numero di PMCs e altera il profilo di localizzazione dei trascritti <i>pax2/5/8</i> e <i>fgfA</i> .....	59 -
2.9.2 L'espressione ectopica di <i>strim1</i> non influenza i livelli di trascritti <i>veg</i> f ma determina un notevole aumento del livello di espressione di <i>otp</i> .....	62 -
2.10 La perdita di funzione di <i>strim1</i> altera il posizionamento delle PMCs e blocca la scheletogenesi .....	64 -
2.10.1 La perdita di funzione di <i>strim1</i> altera l'espressione dei geni <i>pax2/5/8</i> , <i>fgfA</i> , <i>otp</i> ma non influenza i livelli di trascritto <i>veg</i> f .....	68 -
2.10.2 La perdita di funzione di <i>strim1</i> non altera il numero di PMCs ma abolisce l'espressione del gene <i>sm30</i> .....	70 -
2.11 Una sorgente localizzata di <i>strim1</i> ripristina la biomineralizzazione scheletrica in embrioni morfanti .....	71 -
2.12 La perdita di funzione e l'espressione ectopica di <i>pax2/5/8</i> determinano alterazioni della morfogenesi scheletrica.....	73 -
<b>Discussione.....</b>	<b>77 -</b>
3.1 L'organizzazione genomica di <i>strim1</i> e la struttura della proteina putativa riflettono le caratteristiche della famiglia multigenica TRIM/RBCC .....	77 -
3.2 L'espressione specifica di <i>strim1</i> in cellule dell'ectoderma orale influenza la morfogenesi scheletrica dell'embrione di riccio di mare.....	79 -
<b>Conclusioni .....</b>	<b>83 -</b>
<b>Materiali e Metodi .....</b>	<b>84 -</b>
4.1 Isolamento del cDNA codificante per Strim1 e analisi in silico.....	84 -
4.2 Real-Time PCR Quantitativa .....	85 -
4.3 Ibridazioni in situ su embrioni interi (WMISH) .....	86 -

4.4 Preparazione di costruzioni promotore-reporter .....	- 86 -
4.5 Microiniezioni di mRNAs sintetici e oligonucleotidi morfolino antisenso .....	- 87 -
<b>Bibliografia</b> .....	<b>- 89 -</b>
<b>Ringraziamenti</b> .....	<b>- 108 -</b>



## ABSTRACT (Inglese)

Key words: TRIM, E3-ubiquitin ligase, oral ectoderm, skeletogenesis, sea urchin

The recent wealth of genomic data has confirmed that bilaterians as simple as nematodes and as complex as humans use the same basic toolkit of transcription factors and signaling molecules to process spatial and temporal informations during development. Among these regulators, the TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox-Coiled coil) family represents one of the largest classes of putative E3 ubiquitin ligases that play essential roles in cell cycle regulation and development. Multiple copies of *trim box* containing genes exist in sea urchin. In *Paracentrotus lividus* we have identified a *locus* containing two copies, probably originated from a duplication event, of a gene coding for a TRIM-containing factor that we named *strim1* (sea urchin trim1). Both genes consist of a single exon and share extensive sequence identity. Interestingly, both copies include a transposable element, *Helitron-N2*, in the putative promoter region. This could suggest complex evolution mechanisms for this multigenic family.

As embryogenesis occurs, zygotic transcription of *strim1* starts at the very early cleavage and reaches its maximum at the gastrula stage. From the gastrula stage onward, *strim1* expression fades out and very low amounts of mRNA are detectable at pluteus stage. Very interestingly, whole mount *in situ* hybridization show that *strim1* transcripts are asymmetrically localized in the embryo, being restricted exclusively to the oral ectoderm, especially in front of the positions where the ventro-lateral PMC clusters, that initiate skeletogenesis, will form. Over-expression of *strim1* leads to skeletal abnormalities, while knock down of *strim1* function, by injection of antisense morpholino-substituted oligonucleotides, abrogates PMCs positioning and blocks skeletogenesis. Furthermore, we showed that a clonal source of *strim1*, superimposed on morphant embryos, is able to restore the correct skeletogenic program. Interesting results show that *Otp* and *Pax2/5/8* transcription factor are downstream targets of *Strim1* signaling in ectoderm cells. We also provide evidence that an exogenous source of *otp* or *pax2/5/8*, provided injecting their functional mRNA into *strim1* knocked-down embryos, rescue the skeletal abnormalities caused by blocking of *strim1* translation. Finally we gained evidence that *fgfA* is also part of the same signaling network of *strim1*. So, *strim1* could provide a crucial link between positioning and differentiation of the migrating PMCs, thus leading to the morphogenesis of the embryonic skeleton.

## ABSTRACT (Italiano)

Parole chiave: TRIM, E3-ubiquitina ligasi, ectoderma orale, scheletogenesi, riccio di mare.

La recente acquisizione di consistenti dati genomici ha confermato che organismi bilateri, semplici come i nematodi o complessi come l'uomo, fanno uso degli stessi strumenti di base, quali fattori di trascrizione e molecole segnale, per decodificare le informazioni necessarie allo sviluppo embrionale. Nel contesto di tali regolatori, la famiglia di proteine TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox-Coiled coil) rappresenta una delle principali classi di E3 ubiquitina ligasi putative, che svolgono ruoli essenziali nella regolazione di processi quali ciclo cellulare e sviluppo embrionale. Nel genoma di riccio di mare esistono copie multiple di geni contenenti *trim box*. In particolare, in *Paracentrotus lividus*, è stato identificato un *locus* che include due copie, probabilmente originatesi da un evento di duplicazione, di un gene codificante per il fattore con motivo TRIM, denominato *strim1* (*sea urchin trim1*). Entrambi i geni consistono di un singolo esone e mostrano un'elevata identità di sequenza. Con particolare interesse è stata individuata, a livello del promotore putativo di entrambe le copie di *strim1*, la presenza di regioni di sequenza con elevata identità a segmenti dell'elemento trasponibile *Helitron-N2*. Ciò potrebbe suggerire meccanismi complessi di evoluzione della famiglia multigenica in esame.

Durante l'embriogenesi, la trascrizione zigotica di *strim1* ha inizio a stadi precoci e raggiunge il picco massimo allo stadio di gastrula. I livelli di trascritto si riducono, poi, progressivamente, e allo stadio di pluteo risultano difficilmente rilevabili. Inoltre, esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni interi hanno mostrato che i trascritti *strim1* sono caratterizzati da una localizzazione asimmetrica nell'embrione, ristretta esclusivamente all'ectoderma orale. In particolare, allo stadio di gastrula si riscontra localizzazione ectodermica in corrispondenza dei siti di localizzazione ventro-laterale dei clusters di cellule del mesenchima primario, coinvolte nel processo di scheletogenesi. L'over-espressione di *strim1* determina anomalie scheletriche, mentre la perdita di funzione, indotta mediante l'iniezione in zigoti di oligonucleotidi morfolino antisenso, altera il posizionamento delle PMCs e blocca la scheletogenesi. Tale processo risulta ripristinato da una sorgente clonale di *strim1* in embrioni morfanti. Interessanti risultati mostrano che Otp e il fattore trascrizionale Pax2/5/8 costituiscono bersagli molecolari della segnalazione Strim1 dipendente in cellule ectodermiche. Inoltre,

l'iniezione in zigoti dei relativi trascritti esogeni consente il recupero del corretto programma scheletogenico, bloccato dalla perdita di funzione di *strim1*. Ulteriori evidenze, suggeriscono, infine, che *fgfA* è parte del medesimo network di segnalazione di Strim1. *strim1* svolge, quindi, un ruolo cruciale nel controllo del differenziamento e del posizionamento delle PMCs nell'ambito della morfogenesi dello scheletro embrionale.

## PREFAZIONE

### *Il riccio di mare come modello sperimentale*

È noto che organismi bilateri, semplici come i nematodi o complessi come l'uomo, fanno uso degli stessi strumenti di base, quali fattori di trascrizione e molecole segnale, per decodificare le informazioni necessarie allo sviluppo embrionale (Erwin and Davidson, 2002). Tuttavia la complessità qualitativa di tali strumenti regolatori non è correlata alle dimensioni del genoma o del proteoma, ma risiede nella presenza di fattori coinvolti in più pathways di segnalazione, la cui interazione consente la traduzione del programma genomico di sviluppo a livello morfo-funzionale (Howard and Davidson, 2004).

Gran parte delle attuali conoscenze concernenti fondamentali meccanismi genetici, processi evolutivi e di sviluppo, fisiologia cellulare e patogenesi, deriva da studi condotti su differenti sistemi modello animali, vertebrati e invertebrati (Müller and Grossniklaus, 2010). Tra questi, l'embrione di riccio di mare costituisce un valido modello in cui esplorare la causalità molecolare dei processi chiave dell'embriogenesi, data la sua semplicità morfologica, la manipolabilità sperimentale e un'origine filogenetica comune ai cordati. Gli echinodermi rappresentano il gruppo monofiletico di riferimento, tra i deuterostomi, per studi di comparazione tra sequenze, finalizzate alla comprensione di relazioni evolutive tra organismi, e ricerca concernente lo sviluppo embrionale (Sodergren et al., 2006).

Studi condotti sugli echinodermi hanno contribuito, nel tempo, all'acquisizione di conoscenze circa i meccanismi di specificazione cellulare, la dinamica degli eventi morfogenetici e la struttura di networks di geni regolatori dello sviluppo (McClay, 2011). Lo studio di seguito descritto si inserisce in tale contesto ed è focalizzato sull'analisi funzionale di un nuovo gene regolatore della morfogenesi scheletrica della specie di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Parte dei risultati di tale lavoro sono oggetto della recente pubblicazione dal titolo: "Specific expression of a TRIM-containing factor in ectoderm cells affects the skeletal morphogenetic program of the sea urchin embryo" (Cavalieri et al., 2011).

## INTRODUZIONE

### 1.1 Sviluppo del riccio di mare: fasi fondamentali

Gli Echinodermi costituiscono un *phylum* di Metazoi Deuterostomi esclusivamente marini, dalla struttura del tutto peculiare (Sodergren et al., 2006). I ricci di mare appartengono, all'interno del *subphylum* degli Eleuterozoi, alla classe degli Echinoidei. La specie utilizzata come sistema modello in questo lavoro è *Paracentrotus lividus*, caratterizzata da uno sviluppo di tipo indiretto. Tale specie presenta uova oligo-isoletitiche; la fecondazione è esterna e avviene ad ovulo maturo, in seguito al completamento della meiosi. Tale evento induce attivazione metabolica e lo zigote intraprende un profilo di segmentazione oloblastica radiale stereotipato, inizialmente sotto controllo genetico materno e influenzato dalle caratteristiche della cellula uovo (McClay, 2011). Esso diviene diseguale dal quarto ciclo di divisione (Fig. 1).

In dettaglio, i primi due piani di segmentazione sono meridiani e perpendicolari tra loro, dando origine a quattro blastomeri della medesima dimensione. Il terzo piano è equatoriale, perpendicolare ai precedenti e determina la suddivisione dell'embrione nei due emisferi animale e vegetativo. Al quarto ciclo, la divisione delle cellule animali mediante piani di segmentazione meridiani conduce alla formazione di otto blastomeri uguali, i mesomeri (Summers et al., 1993). La metà vegetativa, invece, va incontro ad una segmentazione equatoriale diseguale, producendo quattro cellule di maggiori dimensioni dette macromeri, e quattro cellule più piccole, situate al polo vegetativo, dette micromeri. Gli otto mesomeri si dividono, quindi, per formare due gruppi sovrapposti di blastomeri animali di grandezza simile: an1 e an2, utilizzando la terminologia di Hörstadius (Gilbert, 2000). Nell'emisfero vegetativo i quattro macromeri si dividono secondo piani meridiani e originano otto derivati dei macromeri. I micromeri si dividono secondo piani equatoriali asimmetrici generando quattro micromeri grandi e quattro micromeri piccoli (Fig. 1).

L'embrione, costituito da trentadue blastomeri, va incontro al sesto ciclo di divisione, caratterizzato dalla comparsa di due popolazioni di blastomeri sovrapposte, veg1 e veg2. Questi si originano da una divisione secondo un piano equatoriale degli otto derivati dei macromeri. Pertanto, l'embrione allo stadio di sessantaquattro cellule presenta una zonazione caratteristica dovuta alla presenza di cinque popolazioni di blastomeri, denominate rispettivamente, in successione dal polo animale verso il polo

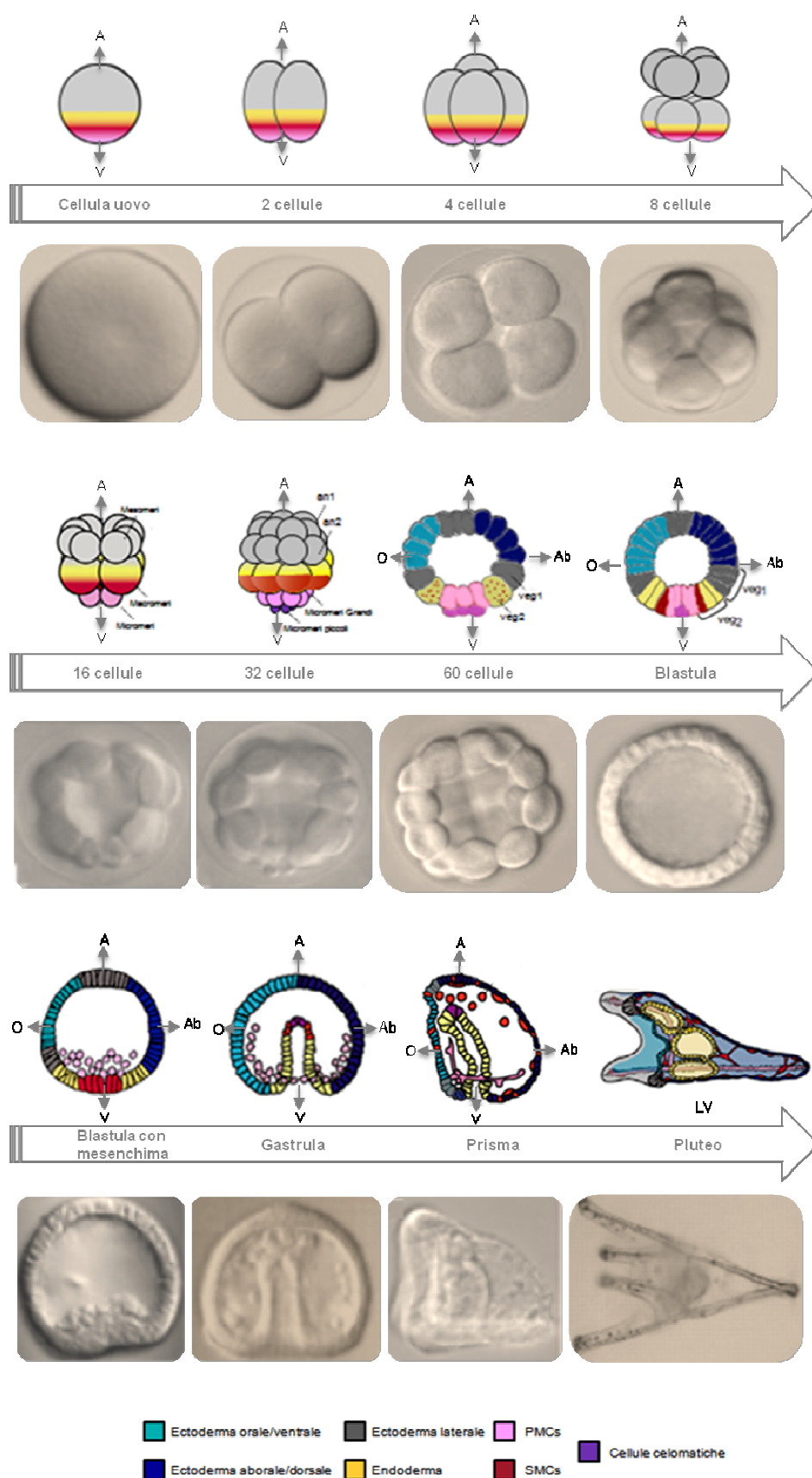
vegetativo: an1 (sedici cellule), an2 (sedici cellule), veg1 (otto cellule), veg2 (otto cellule) e micromeri (sedici cellule).

Mediante analisi dei profili di espressione spaziale di geni differenti ed eleganti studi di marcatura cellulare, è stato possibile acquisire conoscenze dettagliate sui destini differenziativi di tali cellule (Davidson et al., 1998). Sulla base di una recente ridefinizione di tali destini rispetto alla prima mappa dei territori presuntivi di Hörstadius, considerando la polarità dorso-ventrale che si manifesta nell’embrione dopo la gastrulazione, si è desunto che an1, an2 e parte di veg1 daranno origine alla piastra apicale neurogenica e ai domini dell’ectoderma orale e aborale. Una banda ciliata si originerà al confine tra le due zone ectodermiche. Veg2 e la restante parte di veg1 contribuiranno alla formazione dell’intestino larvale, detto *archenteron*, e dei suoi derivati. I grandi micromeri origineranno il mesenchima primario (Logan and McClay, 1997), mentre i micromeri piccoli prenderanno parte alla formazione delle vescicole celomatiche e del mesenchima secondario (cellule pigmentate, immunociti e cellule muscolari) (Franquinet and Foucreir, 2004; Ransick and Davidson, 2006).

È noto inoltre, che durante i cicli di segmentazione si instaura, progressivamente, un asincronismo nel ritmo delle divisioni, dovuto ad un rallentamento divisionale dei micromeri. Si individuano, pertanto, stadi intermedi transitori, ad esempio, di sessanta e centoventi cellule. Oltre a ciò, si verifica una graduale riduzione delle differenze dimensionali tra i blastomeri.

Al settimo ciclo tutte le cellule si dividono secondo piani meridiani generando un embrione di centoventotto cellule.

Raggiunto lo stadio di blastula, all’interno dell’embrione inizia a delinearsi la cavità blastocelica, mentre le cellule acquisiscono, parallelamente, un’organizzazione di tipo epiteliale. Le cellule, disposte in monostrato, sviluppano una lamina basale in corrispondenza del loro versante rivolto verso il blastocele. Sul versante apicale delle cellule si formano dei microvilli, poi sostituiti, nella blastula media, dalla formazione di cilia (Dan-Sohkawa and Fujisawa, 1980). La secrezione nello spazio perivitellino di metalloproteasi (quale l’enzima della schiusa) e i movimenti dell’embrione dovuti al battito ciliare provocano la rottura degli involucri protettivi e liberano una blastula sferica ciliata, capace di nuotare nel mezzo circostante (Lepage et al., 1992). L’embrione è, quindi, allo stadio di blastula schiusa natante.



**Figura 1. Stadi caratteristici dello sviluppo dell’embrione di riccio di mare.** A: polo animale; V: polo vegetativo; O: versante orale; Ab: versante aborale; LV: vista laterale; an1 e 2: blastomeri animali; veg1 e 2: blastomeri vegetativi.

Segue l'evento della gastrulazione, caratterizzata da intensi movimenti morfogenetici che determinano la completa riorganizzazione delle cellule della blastula con la progressiva formazione degli epiteli ectodermico ed endodermico e di cellule mesodermiche intersperse.

Un ruolo chiave nell'ambito della morfogenesi è svolto dal rimodellamento citoscheletrico e da variazioni nell'espressione e localizzazione in membrana di molecole di adesione, quali le caderine. I movimenti morfogenetici coinvolgono l'intero embrione comportando la migrazione di citotipi caratteristici all'interno del blastocele e la formazione di una cavità in comunicazione con l'esterno, destinata a formare l'*archenteron* (Gilbert, 2000).

Poco prima che si manifestino tali movimenti morfogenetici, l'embrione subisce un brusco rallentamento del ritmo mitotico e mostra a ciascuno dei poli evidenti modificazioni. La comparsa di un ciuffo apicale di stereocilia al polo animale si accompagna, infatti, ad un appiattimento e ad un ispessimento della regione del polo vegetativo, che costituisce la cosiddetta piastra vegetativa (Franquinet and Foucreir, 2004). Nella regione centrale della piastra sono localizzate le cellule discendenti dei micromeri che costituiscono il mesenchima primario (PMCs), da cui si origineranno le strutture scheletriche larvali (Ettensohn et al., 2007; Wilt et al., 2008) (Fig. 1). La migrazione di tali cellule all'interno del blastocele caratterizza l'embrione come blastula con mesenchima. Durante questa fase, detta di ingressione del mesenchima primario, le cellule tendono a localizzarsi nella regione prospettica ventro-laterale del blastocele. Ivi si fondono in cordoni sinciziali che costituiscono l'asse delle spicole (Wu et al., 2007). L'embrione a tale stadio è definito gastrula (Fig. 2).



**Figura 2. Embrione di riccio di mare allo stadio di gastrula, osservato mediante microscopia elettronica a scansione.**



La gastrulazione procede con un movimento di invaginazione che riguarda le restanti cellule della piastra vegetativa, che comprende, essenzialmente, il futuro endomesoderma, originato da *veg2* e dai piccoli micromeri. Questa invaginazione causa la formazione di una struttura tubulare corrispondente all'intestino embrionale, un'estremità del quale è a fondo cieco, mentre l'altra si apre all'esterno mediante un blastoporo, che formerà il futuro ano (Kominami and Takata, 2004).

L'*archenteron* si accresce inizialmente mediante un processo di estensione convergente, in cui le cellule si intercalano per restringere il tessuto e, al contempo, per allungarlo (Gilbert, 2000). Più tardivamente, mediante un meccanismo di enterocelia, dalla parete della sommità dell'*archenteron* si distaccano le cellule del mesenchima secondario (SMCs), per formare nel blastocele due vescicole celomatiche dalle quali avranno origine i derivati mesodermici (Franquinet and Foucreir, 2004), tra cui le cellule pigmentate (Kominami and Takata, 2003). In una fase avanzata della gastrulazione si manifestano nell'embrione i primi segni visibili dell'acquisizione progressiva di una simmetria bilaterale ed inizia l'organogenesi.

Nella regione ventrale presuntiva compare un appiattimento e, in seguito, una depressione stomodeale. A livello di quest'ultima si originerà l'apertura orale, che risulta quindi sita nella zona dove l'*archenteron*, incurvandosi in direzione del lato ventrale, entra in contatto con il versante interno della depressione stomodeale. Il campo oro-ventrale così formato si circonda di una banda ciliata circumorale. L'*archenteron* si organizza in tre parti: un esofago e un intestino molto breve e, tra questi, una parte rigonfia corrispondente allo stomaco (Gilbert, 2000).

In seguito si differenzia la larva echinopluteo, o semplicemente pluteo. Ivi la regione circumorale dà origine a quattro espansioni lobate, le braccia, sostenute da spicole scheletriche calcaree. Il pluteo conduce vita libera e nuota grazie ai battiti della corona ciliata circumorale. La larva, che si completa in due giorni dalla fecondazione, possiede una simmetria bilaterale che evolverà, al momento della metamorfosi, verso una simmetria pentaradiale.

Poiché lo sviluppo di *Paracentrotus lividus* è indiretto, l'evento della metamorfosi è fondamentale per generare l'organismo adulto (Franquinet and Foucreir, 2004).

## **1.2 Sviluppo del riccio di mare: basi molecolari**

### **1.2.1 Networks di geni regolatori dello sviluppo**

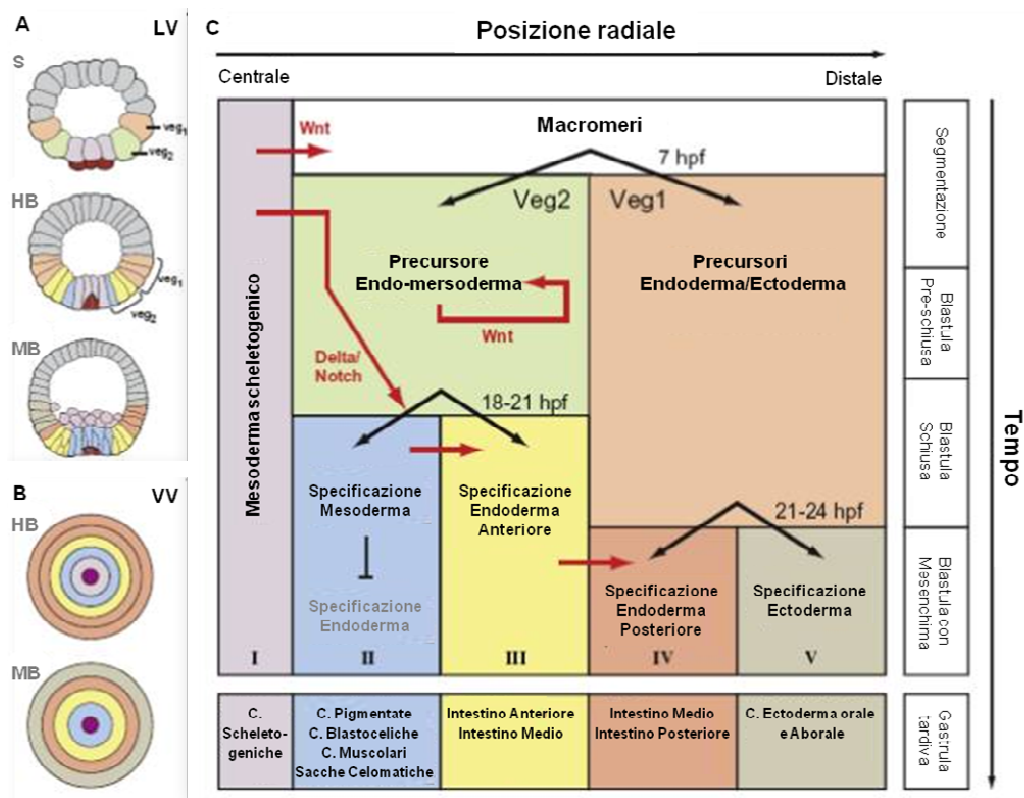
Durante l'embriogenesi una complessa rete di interazioni geniche e segnali regolatori determina la specificazione di territori differenti lungo gli assi embrionali. Geni regolatori multipli, costituenti networks, codificano per fattori trascrizionali materni e zigotici, molecole di segnalazione paracrina, recettori di membrana e fattori intracellulari, che operano in maniera progressiva al fine di generare un complesso programma di sviluppo (Howard and Davidson, 2004; Oliveri et al., 2008). L'architettura di un network di geni regolatori consta, pertanto, di subcircuiti modulari volti ad una regolazione genica spazialmente e temporalmente localizzata (Oliveri and Davidson, 2004). Nell'ambito di ciascun subcircuito, elementi distinti di *cis*-regolazione, equivalenti ai nodi del network, rispondono in maniera combinatoria e condizionale a fattori di trascrizione codificati da altri geni nel modulo. I diversi subcircuiti sono, inoltre, connessi da interazioni geniche crociate di varia natura (Peter and Davidson, 2009b)

Molteplici analisi comparative e studi di perturbazione dell'espressione genica sono stati condotti, in diversi sistemi, al fine di caratterizzare tali palinsesti evolutivi di interazioni regolative (Davidson et al., 2002; Koide et al., 2005; Owraghi et al., 2010; Sandmann et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). Inoltre, negli ultimi anni, il paradigma del network è divenuto un tema pervasivo in studi di carattere biologico, data la crescente disponibilità di dati genomici e l'implementazione di moderne tecnologie. Approcci basati sull'analisi di networks sono stati, recentemente, adottati per descrivere la regolazione dell'embriogenesi in *Drosophila* (Sandmann et al., 2007; Stathopoulos and Levine, 2005), la fisiologia delle cellule immunitarie (Singh et al., 2005), lo sviluppo della vulva nei nematodi e della retina nei vertebrati (Inoue et al., 2005; Mu et al., 2005), oltre alla descrizione dell'organizzazione di pathways metabolici (Chin et al., 2008) e delle basi molecolari di processi neoplastici (Abdollahi et al., 2007).

Il network di geni regolatori dello sviluppo embrionale di riccio di mare costituisce la prima integrazione su larga scala delle informazioni regolative materne e zigotiche durante l'embriogenesi (Sethi et al., 2009). Conoscenze alquanto dettagliate, seppur ancora incomplete, sono state acquisite a riguardo (Peter and Davidson, 2011; Su, 2009).

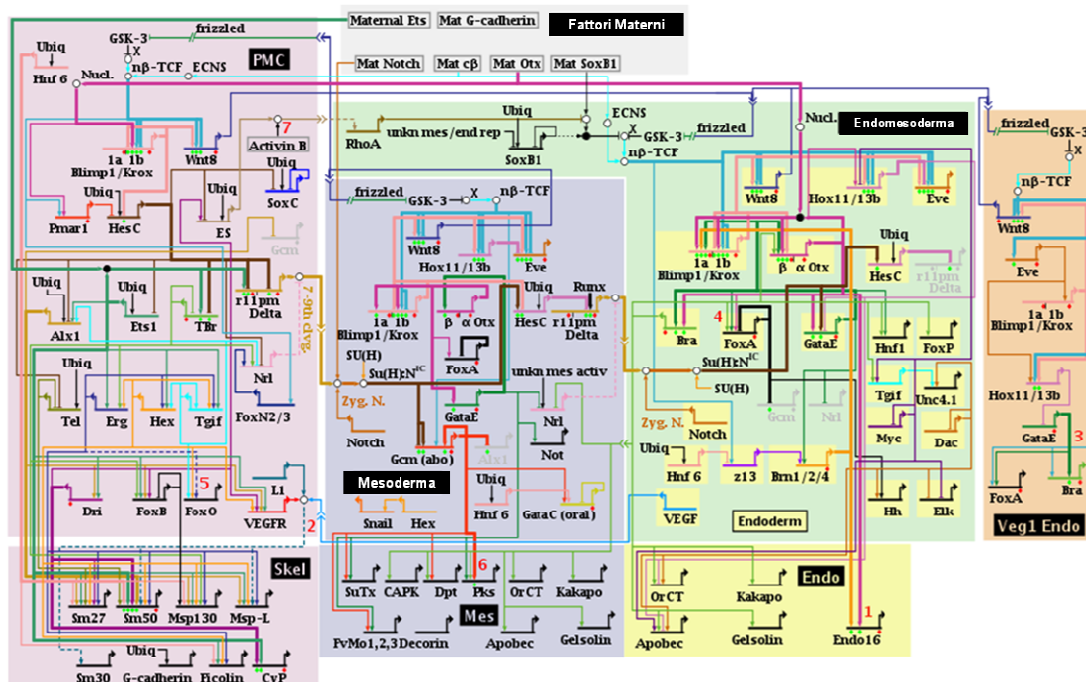
### 1.2.2 Il network di geni regolatori del differenziamento endomesodermico e la specificazione lungo l'asse animale/vegetativo

L'embrione di riccio di mare si organizza rispetto ad un asse animale/vegetativo (AV), determinato prima della fecondazione, e ad un asse orale/aborale (OAb), determinato a livello post-zigotico. La polarità animale-vegetativa è rilevabile nell'embrione dallo stadio di sedici blastomeri, sebbene sia determinata già durante l'oogenesi (Ettensohn, 2006). La cellula uovo di riccio di mare presenta, infatti, distinti gradienti morfogenetici di determinanti citoplasmatici e ciò ne definisce un'organizzazione bipolare (Briggs and Wessel, 2006; Duboc et al., 2005). Come descritto precedentemente, allo stadio più avanzato di sessantaquattro cellule l'embrione mostra una zonazione caratteristica lungo l'asse AV, dovuta alla presenza di distinte popolazioni di blastomeri, localizzate in posizioni invarianti. Esse includono i piccoli micromeri, i grandi micromeri progenitori delle cellule scheleto-geniche, i *lineages* veg2 e veg1 e i precursori dell'ectoderma localizzati nella metà animale dell'embrione (Peter and Davidson, 2009b) (Fig. 3).



**Figura 3. Rappresentazione schematica di eventi di specificazione di domini embrionali** (modificata da Peter and Davidson, 2009b). (A) Sezioni schematiche di embrioni in fase di segmentazione (S) e agli stadi di blastula schiusa (HB) e blastula con mesenchima (MB). LV: vista laterale. (B) Schema della disposizione concentrica degli stati regolativi, indicati con colorazione differente. VV: vista dal polo vegetativo. (C) Diagramma del processo di specificazione territoriale sino allo stadio di gastrula.

Considerata da una prospettiva prettamente molecolare, la specificazione cellulare lungo l'asse AV procede attraverso il progressivo instaurarsi di stati trascrizionali localizzati transientemente nello spazio embrionale (Levine and Davidson, 2005). Essa risiede in una serie di segnali diretti, durante la segmentazione, dal polo animale a quello vegetativo e viceversa, in particolare a partire dai micromeri (Angerer and Angerer, 2000; Revilla-i-Domingo et al., 2007).



**Figura 4. Rappresentazione schematica del network di geni regolatori della specificazione endomesodermica a 30h di sviluppo.** Vista dai nuclei. (Copyright © 2001-2011 Hamid Bolouri and Eric Davidson). Ubiq: ubiquitario; Mat: materno; activ: attivatore; rep: repressore; knk: sconosciuto; ES: segnale precoce; CNS: sistema di nuclearizzazione zigotico; Zyg N.:Notch zigotico.

2003). Nell'embrione di riccio di mare, le cellule endomesodermiche si originano al sesto ciclo di segmentazione, nella metà vegetativa dell'embrione, e i due *lineages* derivati divergono in seguito all'attivazione del pathway di Wnt (Croce et al., 2011; Smith et al., 2007) e sotto il controllo primario del pathway di segnalazione induttiva Delta/Notch (Cameron et al., 1991; Croce and McClay, 2010; Ransick and Davidson, 2006; Sethi et al., 2012). In tale sistema la nuclearizzazione della  $\beta$ catenina in cellule vegetative, inizialmente mediata da processi cellulari autonomi e dipendente dall'associazione al fattore TCF, marca una condizione permissiva per l'instaurarsi degli stati regolativi dello sviluppo endomesodermico (Croce et al., 2011; Lhomond et al., 2012; Materna and Davidson, 2012; Wikramanayake et al., 1998). Nel riccio di mare la  $\beta$ catenina è antagonizzata dal fattore di trascrizione materno SoxB1. In particolare esiste un sistema di regolazione reciproca. In seguito ad espressione precoce, uniforme nell'embrione, tale gene non è più espresso, in maniera progressiva nei territori vegetativi, tra cui i micromeri. Ciò si verifica mediante un meccanismo di repressione trascrizionale, coadiuvato dalla degradazione post-traduzionale di SoxB1 (Angerer et al., 2005).

In particolare, nei precursori delle cellule del mesenchima primario è attivo un network di fattori di trascrizione zigotici che include Pmar1 (Paired-class micromer anti-repressor1), il quale agisce come regolatore negativo, attivando, mediante un meccanismo di anti-repressione, la trascrizione di geni PMC specifici. Essi costituiscono il network dei geni regolatori del differenziamento scheletogenico, descritto in dettaglio in paragrafi successivi. Il gene *pmar1* risulta represso nei restanti territori embrionali (Oliveri et al., 2003; Oliveri et al., 2008; Revilla-i-Domingo et al., 2007). Recenti evidenze, indicano, comunque, che l'attivazione del network scheletogenico avvenga attraverso un meccanismo più complesso, distinto dalla repressione trascrizionale mediata da *pmar1* (Sharma and Ettensohn, 2010). Successivamente, in risposta a segnali derivanti dai micromeri, parte delle cellule veg2 contribuiranno al territorio endodermico (Sethi et al., 2009). Un differente subcircuito del network sarà, invece, reclutato per la specificazione endodermica dei discendenti dell'anello veg1, che costituiranno, prevalentemente la porzione posteriore dell'intestino larvale (Peter and Davidson, 2010).

Dati in letteratura suggeriscono che il pathway canonico di segnalazione di Wnt interviene nella specificazione dei tessuti vegetativi lungo l'asse AV dell'embrione (Stamateris et al., 2010; Wikramanayake et al., 2004). I componenti molecolari di tale

pathway risultano conservati tra i vertebrati (Heasman et al., 2000; Langdon and Mullins, 2011; Pai et al., 1997) e proteine omologhe di vertebrati e riccio di mare appaiono funzionalmente intercambiabili e sono, probabilmente, regolate con le stesse modalità (Croce et al., 2006; Vonica et al., 2000; Weitzel et al., 2004). Tali similarità tra i vertebrati e il riccio di mare indicano una possibile conservazione dei networks molecolari che regolano gli eventi di specificazione spaziale tra echinodermi e cordati. Studi recenti hanno dimostrato che il fattore materno Wnt6 contribuisce all'attivazione di geni regolatori del differenziamento endodermico, coadiuvato dal fattore Dishevelled, localizzato a livello del *cortex* vegetativo della cellula uovo, e da ulteriori interattori non ancora identificati (Croce et al., 2011). Uno dei bersagli molecolari di tale segnalazione è il gene zigotico *wnt8*, appartenente alla famiglia di geni *wnt* espressi a stadi precoci nell'embrione di riccio di mare (Croce et al., 2006; Smith et al., 2007). Il prodotto di tale gene appare coinvolto nella regolazione del profilo di espressione toroidale e concentrico di geni regolatori del differenziamento endomesodermico, quale il gene *blimp1*, incluso nel medesimo subcircuito del network. Ciò implica la progressiva espressione di entrambi i suddetti geni, dapprima a livello dei micromeri, successivamente a livello delle cellule del mesenchima non scheletogenico ed, infine, ristretta ai soli precursori endodermici. Inoltre, i fattori  $\beta$ catenina e Otx sono richiesti per l'attivazione precoce, di, rispettivamente, *wnt8* e *blimp1* (Livi and Davidson, 2006; Smith et al., 2007) (Fig. 4). Studi di *cis*-regolazione addizionali indicano che i geni *hox11/13b* ed *evenskipped* risultano controllati in maniera diretta da tale sub circuito (Sethi et al., 2012; Smith et al., 2008). In assenza di  $\beta$ catenina, l'espressione di numerosi geni del network del differenziamento endomesodermico risulta antagonizzata dall'azione del repressore Groucho, complessato al fattore TCF (Daniels and Weis, 2005; Range et al., 2005).

Un profilo di espressione toroidale analogo a quello dei geni *wnt8-blimp1*, ma indipendente dal suddetto circuito, è stato recentemente illustrato per quanto concerne il gene *foxn2/3*, appartenente alla famiglia *forkhead*. L'espressione tardiva in territorio endodermico non risulta dipendente dall'espressione precoce di *foxn2/3* nei micromeri né da segnali derivanti dalle PMCs, sebbene FoxN2/3 contribuisca a talune fasi della morfogenesi scheletrica. L'espressione del gene risulta, inoltre, Delta-indipendente (Rho and McClay, 2011). D'altro canto, il prodotto codificato dal gene *blimp1* è coinvolto nella regolazione negativa del repressore di Delta, HesC, consentendone a stadi più tardivi, la trascrizione in cellule del mesenchima non scheletogenico (Smith

and Davidson, 2008). L'espressione del ligando Delta è, comunque, inizialmente limitata ai micromeri, di cui regola le proprietà di segnalazione e la morfogenesi tardiva. Il recettore Notch è attivato nelle cellule *veg2* limitrofe che ricevono tale segnale e la progenie generata diviene mesenchima secondario (Croce and McClay, 2010; Sweet et al., 2002). Recenti evidenze sottolineano, comunque, un ruolo della segnalazione dipendente da Notch nella segregazione endomesodermica, oltre che nell'attivazione di geni mesoderma specifici. In particolare, Notch inibisce, a livello del mesoderma presuntivo, l'espressione del fattore endodermico Hox11/13b coinvolto nell'attivazione del pathway canonico di Wnt. Inoltre, la rimozione pregastrulare Notch-dipendente del fattore TCF, coattivatore della  $\beta$  catenina, dai nuclei delle cellule mesodermiche, le rende refrattarie alla segnalazione Wnt-dipendente e, pertanto, all'acquisizione del destino endodermico (Sethi et al., 2012).

A livello molecolare, le cellule endomesodermiche risultano definite dalla co-espressione di geni che risulteranno alternativamente espressi, in definitiva, in territorio endodermico e mesodermico. In particolare, il gene *gcm* (*glial cells missing*), bersaglio diretto della suddetta segnalazione Delta/Notch, è coinvolto nella specificazione e nel differenziamento delle cellule pigmentate, un derivato delle cellule mesenchimali non scheletogeniche (Croce and McClay, 2010; Ransick et al., 2002). Viceversa il gene *foxA* è richiesto per lo sviluppo dell'endoderma, in cui è espresso (Oliveri et al., 2006).

Il profilo di localizzazione di *gcm*, in un embrione a stadi precoci sviluppo, si sovrappone parzialmente a quello del gene *foxA*, ma da esso si diversifica in fasi successive. Tali geni, infatti, si inseriscono nel contesto di un subcircuito più complesso del network di geni regolatori del differenziamento endomesodermico. FoxA è in grado di reprimere l'espressione di *gcm* ed è probabile che questi sia, a sua volta, coinvolto in eventi di autoregolazione (Ransick and Davidson, 2006). Inoltre, i geni *gatae* e *otx* forniscono uno stimolo nel sistema di regolazione pregastrulare di *foxA*, il cui prodotto reprime la sua stessa trascrizione, generando un profilo temporale di espressione oscillatorio. *foxA* risulta, infine, espresso anche a livello dell'ectoderma stomodeale (de Leon and Davidson, 2010; Oliveri et al., 2006). Un sistema di regolazione di analoga architettura è stato documentato in *zebrafish* (Bally-Cuif et al., 2000).

### **1.2.3 Il network di geni regolatori del differenziamento ectodermico e la specificazione dell'asse orale/aborale**

Allo stadio più avanzato di blastula tardiva, ulteriori segnali concorrono a rendere l'embrione di riccio di mare un "mosaico" di territori distinti, ciascuno dei quali è determinato dai domini di espressione di geni rappresentativi (Ettensohn, 2009; Saudemont et al., 2010). La diversificazione tra i destini ectodermico ed endodermico nei derivati di *veg1* avviene poco dopo la distinzione tra mesoderma ed endoderma nei discendenti del *lineage* *veg2*, indicando che gli eventi di specificazione risultano regolati in maniera spazio-temporale, a partire dalle cellule più centrali del polo vegetativo sino ai discendenti distali delle cellule *veg1*. In particolare, il confine tra ectoderma ed endoderma si forma all'interno del dominio individuato dal *lineage* *veg1*, alla periferia della piastra vegetativa, superato lo stadio di blastula con mesenchima (Peter and Davidson, 2009b). I derivati dei mesomeri, componente animale dell'embrione, contribuiscono, comunque, in maniera prevalente rispetto ad altri *lineages*, alla formazione dei domini ectodermici, seppure in risposta a segnali induttivi derivanti dall'emisfero vegetativo (Kominami et al., 2006; Wikramanayake et al., 1995). Successivi movimenti morfogenetici implicano, poi, la completa riorganizzazione delle cellule della blastula con la progressiva formazione degli epiteli ectodermico ed endodermico e di cellule mesodermiche intersperse. Allo stadio di gastrula, in particolare, risulta morfologicamente riconoscibile nell'embrione un'asse di polarità orale/aborale (OAb), noto anche come asse dorso/ventrale (D/V) in organismi superiori, che si estende dalla cavità orale al lato opposto dell'embrione. Rispetto all'asse OAb si distinguono l'ectoderma orale e l'ectoderma aborale, costituito da cellule epiteliali squamose, separati da una banda di cellule cuboidali (Duboc and Lepage, 2008; Range et al., 2007). Il momento al quale l'asse OAb è specificato in maniera condizionale varia dallo stadio di due cellule, in *Strongylocentrotus purpuratus* (Cameron et al., 1989) allo stadio di otto cellule, in altre specie (Kominami, 1988). La sua determinazione avviene nell'embrione allo stadio di trentadue cellule (Raunich et al., 1998). La relazione tra l'orientamento del primo piano di segmentazione e il posizionamento dell'asse OAb varia anch'essa a seconda della specie (Davidson et al., 1998). Dati recenti suggeriscono, infatti, che un'asimmetria nella distribuzione mitocondriale lungo l'asse OAb presuntivo possa rappresentare un presupposto precoce per la specificazione dell'ectoderma orale (Coffman and Denegre, 2007; Coffman et al., 2004), dipendente da una combinazione di segnali materni ereditabili e interazioni



induttive tra i blastomeri (Angerer and Angerer, 2003; Coffman et al., 2004). Ciò è stato riscontrato in organismi deuterostomi a differenti livelli della scala evolutiva. In embrioni vertebrati anamnioti, quali *Xenopus*, fattori materni risultano essenziali per attivare l'espressione di un network conservato di geni regolatori nella regione dorsale, creando un "organizzatore" che regola la specificazione dell'asse D/V (Kimelman, 2006). In embrioni di pollo e murini si pensa che la specificazione di tale asse giaccia esclusivamente su fattori zigotici (Bertocchini et al., 2004; Chen et al., 2006). Tuttavia esiste un elevato grado di conservazione, tra tutti i sistemi suddetti, per quanto concerne l'azione sinergistica di pathways fondamentali per la specificazione dell'organizzatore (Nodal, Vg1, pathway canonico di Wnt) (Andersson et al., 2006). Nell'embrione di riccio di mare la polarizzazione dell'asse OAb dipende principalmente da interazioni cellulari mediate dal fattore Nodal, appartenente alla famiglia di fattori TGF $\beta$  (Duboc et al., 2004; Lapraz et al., 2006). Allo stadio di blastula la suddetta asimmetria si riflette nell'attivazione, ristretta al versante orale, della chinasi p38, richiesta per l'espressione laterale del gene *nodal* (Bradham and McClay, 2006). Sebbene la sua espressione sia ristretta al versante orale dell'embrione, la funzione di *nodal* appare fondamentale per la specificazione di territori orali e aborali (Lapraz et al., 2009). Nell'ectoderma orale l'espressione di *nodal* è mantenuta da circuiti a feedback positivo intraterritoriali (Nam et al., 2007). Ivi Nodal attiva l'espressione di geni codificanti per fattori trascrizionali e molecole di segnalazione chiave, che includono il proprio antagonista *lefty*, il repressore *gooseoid* (*gsc*), *foxA*, *chordin* e *bmp2/4* (*bone morphogenetic protein 2/4*), essenziali per la specificazione dei destini cellulari lungo l'asse OAb (Duboc et al., 2004; Lapraz et al., 2009; Saudemont et al., 2010). Gross et al., hanno, inoltre, identificato il gene *tbx2/3*, codificante per un fattore trascrizionale T-box, quale bersaglio molecolare della segnalazione di Nodal nell'ectoderma aborale (Gross et al., 2003). BMP2/4 assicura l'attività a lungo raggio di Nodal, in quanto molecola di segnalazione paracrina sintetizzata a livello dell'ectoderma orale e traslocata, successivamente, sul versante opposto dell'embrione. Inoltre, Nodal e BMP2/4 regolano l'espressione di molecole di segnalazione e fattori trascrizionali in territorio endodermico e mesodermico, imponendo, così, una polarità OAb a tutti e tre gli strati germinativi. L'equilibrio tra i segnali di BMP2/4 prodotti dalla progenie delle cellule animali e opposti segnali vegetativizzanti trasdotti durante la segmentazione, determina i confini tra ectoderma ed endoderma (Angerer et al., 2000; Duboc et al., 2010).

Analogamente ai sistemi *Xenopus* e *Zebrafish*, nell'embrione di riccio di mare sono necessari fattori materni, tra cui Vg1/Univin, orologio di Vg1/GDF1, per attivare la specificazione territoriale lungo l'asse OAb (Tanaka et al., 2007).

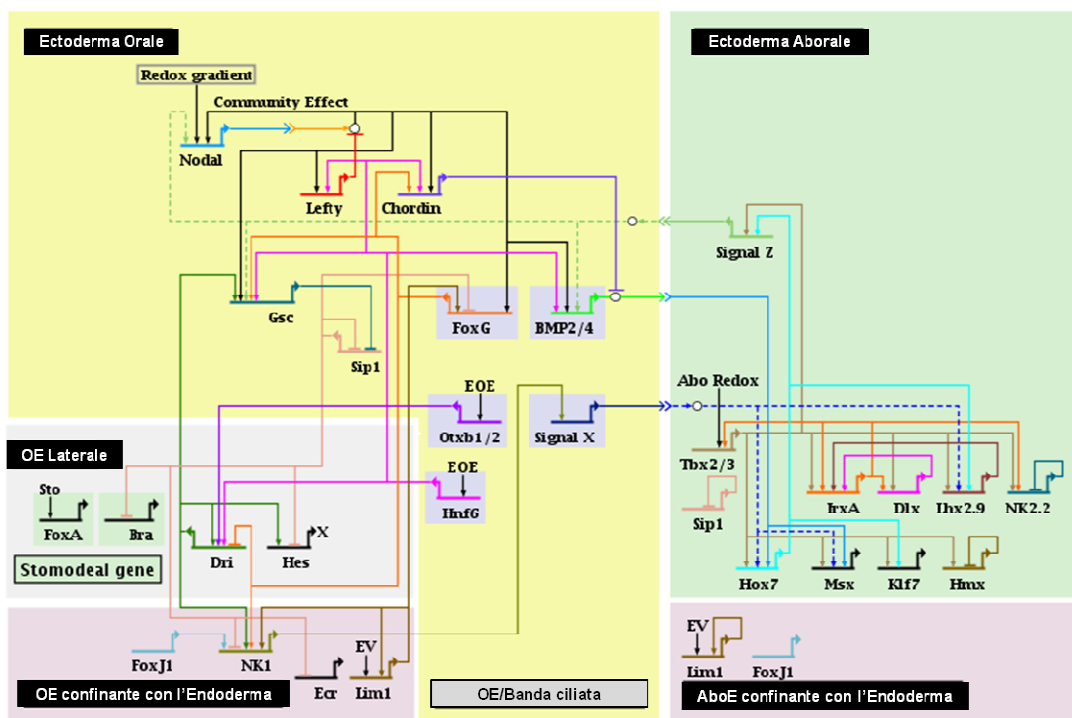
Complesse interazioni funzionali sussistono, inoltre, tra componenti del network di geni regolatori espressi in territorio ectodermico e componenti endomesodermiche. Esse spiegano come un'anisotropia iniziale sia tradotta in uno stato di regolazione trascrizionale polarizzato (Su, 2009). Infine, recenti evidenze individuano in Oct1/2 un fattore materno importante nell'indurre la formazione dell'asse OAb, modulando l'espressione zigotica di *nodal* e *vg1/univin* (Range and Lepage, 2011).

Mediante la combinazione di esperimenti di ibridazioni *in situ*, overespressione di mRNAs e saggi di perdita di funzione è stata identificata una coorte di geni regolatori espressi, durante lo sviluppo, in domini ectodermici presuntivi dell'embrione, in cui svolgono funzioni diversificate (Bolouri and Davidson, 2010; Saudemont et al., 2010). Il livello di espressione di molti di tali geni risulta incrementato dal trattamento degli embrioni con cloruro di zinco (Poustka et al., 2007). Sono state, inoltre, definite le principali relazioni epistatiche tra di essi, parte delle quali risultano indirette a causa delle funzioni pleiotropiche svolte da gran parte dei geni regolatori (Saudemont et al., 2010; Su et al., 2009).

L'attuale network di geni regolatori del differenziamento ectodermico include funzioni di specificazione pregastrulare e geni espressi a 24-30 ore di sviluppo nell'ectoderma orale e aborale (Fig. 5). Tuttavia risulta meno dettagliato rispetto alla controparte endomesodermica (Chen et al., 2011; Su, 2009). Inoltre, l'ectoderma orale si risolve in diversi subdomini caratterizzati dall'espressione di geni marcatori. Si individua la banda ciliata, identificata dall'espressione di *hnf6* (Otim et al., 2004), *otxβ1/2* (Yuh et al., 2002), e *foxg* (Tu et al., 2006) e il dominio laterale, in cui risultano espressi i geni *gsc* (Angerer et al., 2001) e *deadringer (dri)* (Amore et al., 2003). In particolare, ivi l'azione repressiva di Goosecoid è antagonizzata dal fattore Deadringer, caratterizzato da un profilo di espressione bifasico ristretto alle PMC e successivamente all'ectoderma orale e richiesto, parallelamente, per il differenziamento scheletogenico (Amore et al., 2003). Si individua, poi, il subdominio stomodeale marcato dall'espressione di *foxa* (Oliveri et al., 2006) e *brachiury (bra)* (Rast et al., 2002) (Fig. 5). Un'ulteriore regione è localizzata all'interfaccia con l'endomesoderma vegetativo e comprende sia ectoderma orale che aborale, esprimendo, rispettivamente, i geni *nk1* (Minokawa et al., 2004; Rast et al., 2002) e *lim1* (Kawasaki et al., 1999).

Un piccolo gruppo di cellule della piastra apicale dell'embrione, definito dalla progressiva restrizione dell'espressione dei geni *foxQ2* (*forkhead Q2*) e *Six3* (*sine oculis-related homeobox 3 homolog*) inizia la specificazione di precursori neurali (Wei et al., 2009; Yaguchi et al., 2008). Ivi l'azione di BMP2/4 è antagonizzata dal fattore con domini a dita di zinco Fez (Yaguchi et al., 2011). La neurogenesi si compie, inoltre, successivamente, in un sottogruppo di cellule della banda ciliata, attivando un elaborato network neurale allo stadio di pluteo (Saudemont et al., 2010).

Recenti evidenze suggeriscono l'esistenza di precursori neuro-endodermici nella porzione anteriore dell'intestino larvale, grazie alla ritenzione di uno stato di pluripotenza SoxB1-dipendente (Wei et al., 2011a). La ristretta espressione di *foxq2* alla piastra animale rappresenta, poi, un elemento cruciale del pathway canonico di segnalazione di Wnt che coordina la specificazione territoriale lungo l'asse AV con i medesimi eventi lungo l'asse OA (Yaguchi et al., 2008).



**Figura 5. Rappresentazione schematica del network di geni regolatori della specificazione ectodermica tra 24 e 30h di sviluppo.** Vista dai nuclei (Copyright © 2007-2009 Yi-Hsien Su, Alex Kraemer and Eric Davidson). EOE: input precoce dell'ectoderma orale (Nodal-indipendente); EV: input vegetativo precoce (Nodal-indipendente); Sto: input spaziale sconosciuto dello stomodeo.

Per quanto concerne l'ectoderma aborale, che costituirà l'epitelio di rivestimento della larva, esso è considerato un territorio più semplice a causa, inoltre, della carenza di studi approfonditi di espressione genica in tale regione (Chen et al., 2011). Oltre al già citato gene *tbx2/3* (Gross et al., 2003), sono ivi espressi i marcatori *spec1A* e *spec2A* (Tomlinson and Klein, 1990) e il gene *cyIIIa*, codificante per un'actina citoscheletrica (Lee et al., 1986), oltre a pochi fattori trascrizionali addizionali noti (Chen et al., 2011). Con particolare interesse è stata riscontrata l'espressione nei precursori dell'ectoderma aborale del gene codificante per il fattore con omeodominio Hbox12, identificato nella specie *P. lividus* (Di Bernardo et al., 1995).

*Hbox12*, appartenente alla classe dei geni *paired*, è caratterizzato da un profilo di espressione transiente e precoce in un numero limitato di cellule della metà animale-laterale dell'embrione, i cui discendenti costituiranno parte del dominio ectodermico aborale, nella cui specificazione è probabile che *Hbox12* svolga un ruolo primario (Cavalieri et al., 2008). Nel genoma di *P. lividus* sono state identificate copie multiple del gene *Hbox12*, alcune delle quali sono organizzate in tandem, suggerendo che possano essere state generate da eventi ancestrali di duplicazione genica. Non sono stati individuati ortologhi di *Hbox12* in altre specie di riccio di mare, sebbene il prodotto dei geni *Pmar1*, identificato in *S. purpuratus* (Oliveri et al., 2002) e *L. variegatus* (Wu and McClay, 2007), e dei geni *micro1* di *H. pulcherrimus* (Kitamura et al., 2002) e *A. crassispina* (Nishimura et al., 2004) presenti il più elevato grado di similarità di sequenza con il prodotto del gene *Hbox12*. Analogamente, non è stato riscontrato *Hbox12* nei vertebrati, sebbene nel genoma di riccio di mare siano stati identificati ortologhi e paraloghi di tutti i geni con homeobox presenti in vertebrati superiori, tra cui l'uomo. Essi includono geni tessuto specifici la cui espressione risulta, pertanto, spazialmente localizzata e temporalmente regolata (Howard-Ashby et al., 2006).

Differenti regolatori concorrono a determinare il profilo di espressione caratteristico del gene *Hbox12*, tra i quali l'attivatore trascrizionale Otx (Angerer et al., 2001). Nella fattispecie, dati in letteratura evidenziano il coinvolgimento di fattori trascrizionali con omeodominio nella specificazione dei domini ectodermici orale, aborale e neurogenico, quali Gsc, Otx ed Engrailed (Angerer et al., 2001; Yaguchi et al., 2006), oltre che nella regolazione di eventi morfogenetici, quali la scheletogenesi, come Orthopedia (Otp) (Cavalieri et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999). Il gene *otp* è caratterizzato, in *P. lividus*, da un profilo di espressione simmetrico, ristretto ad un numero limitato di

cellule, non contigue, dell'ectoderma ventrolaterale dell'embrione a partire dallo stadio di mid-gastrula (Di Bernardo et al., 1999).

*Otp* si inserisce nel network dei geni regolatori del differenziamento ectodermico a valle di *dri*, in quanto l'inibizione della funzione di quest'ultimo blocca l'espressione di *otp* e il programma di morfogenesi scheletrica (Amore et al., 2003), nella cui regolazione, nel sistema in esame, *otp* svolge un ruolo primario (Cavalieri et al., 2003). L'ortologo nel modello murino ed in embrioni di *Drosophila* è, invece, coinvolto nella specificazione di destini neurali di discendenti ectodermici (Simeone et al., 1994; Wang and Lufkin, 2000). In particolare, ne è stato recentemente documentato un ruolo nel controllo dello sviluppo di neuroni diencefalici dopaminergici in embrioni di *zebrafish* e di mammifero (Ryu et al., 2007). Tali casi potrebbero costituire un esempio di ortologia funzionale per un gene reclutato in subcircuiti differenti di un network di regolazione in risposta al processo evolutivo.

I geni codificanti per fattori di trascrizione, appartenenti a famiglie distinte, svolgono un ruolo di primaria importanza nell'ambito del network in esame. La conoscenza primaria del profilo spazio-temporale di espressione di tali geni è, dunque, essenziale per comprendere l'architettura del network stesso. È noto, inoltre, che un numero crescente di geni codificanti per regolatori trascrizionali, oltre ai già citati, sia attivato nelle cellule dell'ectoderma presuntivo dell'embrione di riccio di mare. Tra questi, il gene zigotico *pax2/5/8*, codificante per un fattore trascrizionale con dominio *paired*, è espresso a partire dallo stadio di gastrula precoce in due domini ectodermici ventro-laterali dell'embrione (Rottinger et al., 2008). Membri conservati della subfamiglia Pax2/5/8 sono stati isolati in *C.elegans*, *Drosophila* (Czerny et al., 1997), in *zebrafish* e nei vertebrati, dove regolano processi distinti, quali il differenziamento di strutture neuro-sensoriali (Hans et al., 2004; Stuart et al., 1994) e l'organogenesi di strutture uditive (Bouchard et al., 2010). Nel modello riccio di mare, i geni *otp* e *pax2/5/8* appartengono al medesimo gruppo di espressione dei geni *vegf* (*vascular endothelial growth factor*) e *fgfA* (*fibroblast growth factor-A*). Durante l'embriogenesi, infatti, oltre ai fattori trascrizionali, segnali intercellulari e molecole recettoriali contribuiscono all'attivazione persistente di nuovi nodi di processamento dell'informazione, con il concomitante incremento della complessità regolativa dell'embrione. I geni codificanti per i ligandi suddetti sono espressi, nell'embrione allo stadio di gastrula, in regioni localizzate dell'ectoderma, in corrispondenza dei siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs, cellule a cui è ristretta l'espressione dei geni codificanti per i

relativi recettori a tirosin chinasi (*vegfr10* e *fgfr2*) (Duloquin et al., 2007; Rottinger et al., 2008). Mutazioni che implicano una alterata regolazione della segnalazione Fgf dipendente determinano molteplici disordini dello sviluppo, incluse patologie scheletriche dominanti e neoplasie, anche in organismi superiori (Ornitz and Marie, 2002). In letteratura è riportata, inoltre, l'induzione di risposte migratorie in citotipi differenti, quali cellule mesodermiche in embrioni murini o di pollo, nel caso di segnalazione Fgf-dipendente (Sun et al., 1999; Yang et al., 2002) o in precursori ematopoietici e cellule neurali da parte di Vegf (Hiratsuka et al., 2005; Zhang et al., 2003). Nell'embrione di riccio di mare tali risposte in cellule del mesenchima primario risultano fondamentali per il processo di spiculogenesi (Duloquin et al., 2007; Rottinger et al., 2008).

### **1.3 La scheletogenesi del riccio di mare: eventi morfogenetici e basi molecolari**

#### **1.3.1 Morfogenesi scheletrica**

Come si evince da quanto descritto nei paragrafi precedenti, esistono molteplici studi in letteratura che riportano numerosi geni regolatori, costituenti networks, essenziali per definire la specificazione territoriale nell’embrione di riccio di mare (Davidson et al., 2002; Smith et al., 2007; Su, 2009). Inoltre, differenti linee di evidenza sottolineano la necessità di stimoli vegetativi per la polarizzazione dell’ectoderma in regioni orali e aborali e, viceversa, segnali regolatori provenienti dai territori ectodermici possono risultare in effetti funzionali a livello endomesodermico (Duboc and Lepage, 2008). Tale architettura regolativa è caratteristica del sistema in esame, in cui i blastomeri subiscono una specificazione di tipo condizionale, ad eccezione della popolazione dei micromeri, caratterizzata da specificazione autonoma, dipendente dalla localizzazione precoce di determinanti materni (Angerer and Angerer, 2003; Etensohn and Sweet, 2000). I micromeri costituiscono una popolazione cellulare riccio-specifica, individuabile al polo vegetativo di un embrione allo stadio di 16 cellule, considerata un ‘invenzione evolutiva recente’ in echinodermi caratterizzati da uno sviluppo di tipo indiretto (Etensohn, 2009). In seguito ad un ciclo di divisione ineguale si determina la formazione di quattro piccoli micromeri e quattro micromeri grandi, questi ultimi progenitori delle cellule del mesenchima primario (PMCs), i precursori scheletogenici (Armstrong et al., 1993). È noto che micromeri isolati allo stadio di 16 cellule, posti in coltura con supplemento di siero o con fluido blastocelico, sono in grado di originare, *in vitro*, cellule scheletogeniche e strutture scheletriche biomineralizzate (Okazaki, 1975). Inoltre, esperimenti di trapianto di micromeri in posizione ectopica, ne dimostrano proprietà induttive con effetto sui blastomeri adiacenti (Ransick and Davidson, 1993). Stimoli provenienti da territori embrionali differenti risultano, tuttavia, essenziali durante le fasi differenziative e di transizione epitelio-mesenchimale dei discendenti dei micromeri (Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008; Wu et al., 2007). Nell’embrione di riccio di mare, infatti, la scheletogenesi è il risultato di una complessa serie di eventi cellulari e molecolari che coordinano il processo morfogenetico. Esso include eventi di transizione epitelio-mesenchimale, migrazione direzionale e fusione cellulare (Etensohn, 2009). Successivamente alla fase di schiusa dalla membrana di fecondazione, il versante vegetativo della blastula subisce un progressivo appiattimento e inspessimento.

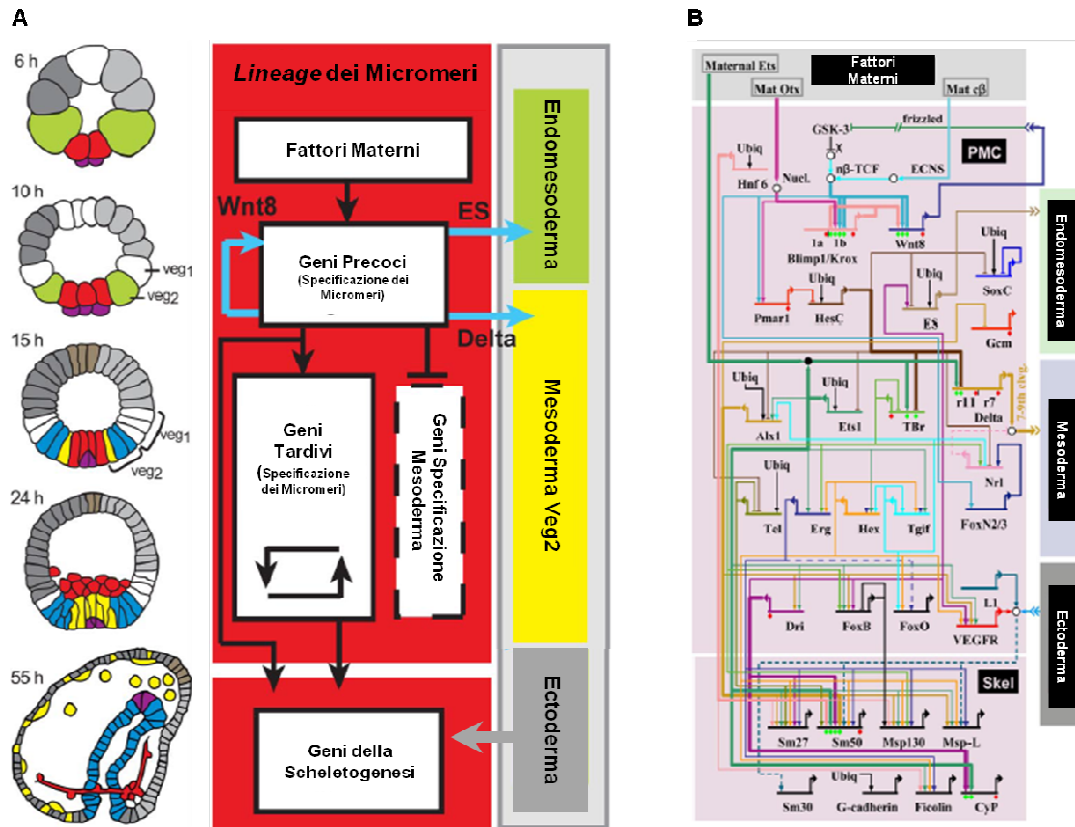
Le PMCs si dissociano dal monostrato epiteliale ed attuano l'ingressione nel blastocele (Gustafson and Wolpert, 1999). Tale evento è associato alla regolazione negativa, sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, dell'espressione di molecole di adesione cellulare (Wu and McClay, 2007). In particolare i precursori delle PMCs perdono la propria affinità per i blastomeri attigui e per lo strato ialino esterno. Viceversa, interagiscono con componenti della lamina basale (Wessel and McClay, 1985). I precursori delle cellule del mesenchima primario delaminano, quindi, nel blastocele, cessano di dividersi e migrano al suo interno in maniera direzionale, estendendo e contraendo lunghi e sottili filopodi, mediante i quali contattano la superficie interna dell'ectoderma, e si localizzano nella regione prospettica ventro-laterale del blastocele, costituendo due clusters. Ivi si fondono in cordoni sinciziali sub-equatoriali che costituiscono l'asse delle strutture scheletriche embrionali. La spiculogenesi ha inizio con la formazione di una coppia di primordi scheletrici bilateralmente simmetrici, che si estendono e si ramificano secondo un profilo stereotipato, generando le spicole triradiate, birifrangenti, costituenti l'endoscheletro larvale (Wu et al., 2007). Esso determina la forma angolare della larva e ne influenza motilità e orientamento (Wilt et al., 2008).

### **1.3.2 Il network dei geni regolatori del differenziamento scheletogenico: struttura e considerazioni evolutive**

Sebbene gli eventi biochimici che guidano i cambiamenti nel comportamento cellulare siano probabilmente regolati anche da meccanismi post-traduzionali, è opportuno considerare lo stato morfogenetico globale di una cellula come il risultato di un network di geni regolatori che opera precocemente in un determinato *lineage* (Ettensohn, 2009). In particolare, l'attivazione del network dei micromeri-PMCs giace sull'interpretazione di anisotropie di origine materna (Fig. 6). Il complesso  $\beta$ catenina/Tcf, localizzato precocemente nei nuclei dei micromeri, attiva, esclusivamente in tale citotipo, l'espressione zigotica del repressore trascrizionale *pmar1* (Oliveri et al., 2003; Yamazaki et al., 2005). Un circuito addizionale assicura la continua azione della beta catenina/TCF in tali cellule modulando l'espressione di *wnt8* (Peter and Davidson, 2009b). *Pmar1* previene in maniera sequenziale, l'espressione del repressore HesC (Hairy/Enhancer-of split C), altrimenti ubiquitariamente espresso, consentendo



l'espressione di geni regolatori citotipo-specifici (Oliveri et al., 2008; Revilla-Domingo et al., 2007).



**Figura 6. (A) Rappresentazione schematica di embrioni di riccio di mare in visione laterale e di eventi di specificazione dei precursori scheletogenici** (modificata da Oliveri and Davidson, 2008). Verde: macromeri; rosso: *lineage* dei micromeri scheletogenici; viola: piccoli micromeri; giallo: mesoderma non scheletogenico; blu: endoderma, intestino; marrone: dominio neurogenico apicale; grigio scuro: ectoderma aborale; grigio chiaro: ectoderma orale. **(B) Rappresentazione schematica del network dei geni regolatori della scheletogenesi** (Copyright © 2001-2011 Hamid Bolouri and Eric Davidson). Ubiqu: ubiquitario; Mat: materno; activ: attivatore; rep: repressore; nkn: sconosciuto; Nucl: nuclearizzazione; x: fonte di  $\beta$ -catenina;  $\beta$ -TCF:  $\beta$ -TCF nucleare; ES: segnale precoce; ECNS: sistema di nuclearizzazione precoce; Zyg N.:Notch zigotico.

Tra i bersagli precoci del doppio controllo negativo mediato da Pmar1 e HesC rientrano il ligando di delta Notch (Sweet et al., 2002), i geni *alx1* (*aristaless-like homeobox1*) (Ettensohn et al., 2003), *ets1* (*E26 transformation specific 1*) (Kurokawa et al., 1999; Rizzo et al., 2006) e *tbr* (*T-brain*) (Fuchikami et al., 2002), regolatori dell'identità PMC, oltre a *twist* e *snail*, coinvolti nell'induzione dell'ingressione del mesenchima primario. I geni suddetti codificano per fattori trascrizionali che attivano, a loro volta, geni

regolatori tardivi, inclusi *erg* (*ets-related gene*), *hex* (*hematopoietically expressed homeobox*), *tgif* (*TG-interacting factor*) (Fig. 6). Recentemente è stato, comunque, dimostrato che la trascrizione dei geni *alx1* e *delta* avviene indipendentemente dal circuito di controllo Pmar1/HesC, sottolineando, ulteriormente, la complessità dell'attivazione del programma scheletogenico (Sharma and Ettensohn, 2010). Viceversa, Pmar1, Ets1 e Tbr risultano necessari per l'attivazione dell'espressione del gene *foxn2/3* nei micromeri, allo stadio di blastula alla schiusa. Sulla base di recenti evidenze sperimentali, ottenute nella specie di riccio di mare *Lytechinus variegatus*, FoxN2/3 è necessario per la corretta ingressione delle PMCs nella cavità blastocelica e per la successiva fusione sinciziale, oltre che per la prevenzione di eventi di trans-differenziamento e per l'espressione di geni codificanti per proteine di matrice delle spicole (Rho and McClay, 2011). Inoltre, recenti esperimenti di re-ingegnerizzazione del network scheletogenico hanno rilevato funzioni di esclusione criptiche. In particolare, l'espressione forzata del gene *gcm* in precursori del mesenchima primario ne reprime l'acquisizione di un destino scheletogenico e induce l'attivazione ectopica del programma di differenziamento in cellule pigmentate. Appare plausibile un'azione repressiva di Gcm sull'espressione dei geni *alx1* e *ets1* (Damle and Davidson, 2012).

Interazioni trascrizionali nell'ambito del suddetto network culminano con l'attivazione dell'espressione di geni del differenziamento terminale, codificanti per proteine morfo-regolatrici, responsabili del controllo dell'anatomia scheletrica, e prodotti proteici coinvolti nel processo di formazione dell'endoscheletro (Oliveri et al., 2008; Rafiq et al., 2012). Uno studio recente ha contribuito ad identificare il repertorio completo di geni correlati alla biomineralizzazione fornendo un quadro globale del livello terminale del network scheletogenico (Livingston et al., 2006; Rafiq et al., 2012). Tra i geni espressi limitatamente ai precursori scheletogenici rientrano i geni *SM50* (Benson et al., 1987), *sm30* (George et al., 1991), *Pm27* (Harkey et al., 1995) e *SM37* (Lee et al., 1999), i cui prodotti costituiscono proteine di matrice delle spicole. La famiglia genica *sm30* (*spicule matrix protein 30*) consta, in *S. purpuratus*, di un cluster di sei geni paraloghi, parte dei quali risultano espressi selettivamente in domini scheletrici embrionali e/o larvali (Livingston et al., 2006) (Fig. 6). Similmente, nei vertebrati, i geni codificanti per proteine secrete associate ad eventi di biomineralizzazione sono organizzati in clusters nel genoma, sebbene esistano differenze nella sequenza primaria di tali proteine rispetto al riccio di mare (Kawasaki and Weiss, 2006). D'altro canto la similarità di meccanismi cellulari e componenti del corredo molecolare preposto alla

biomineralizzazione tra echinodermi e vertebrati ne suggerisce profonde relazioni evolutive (Livingston et al., 2006). Diverse linee di evidenza dimostrano che l'espressione di *sm30*, in *P. lividus*, è associata alla deposizione di elementi scheletrici ed è strettamente dipendente da segnali provenienti dall'ectoderma (Cavalieri et al., 2003; Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008).

Le PMCs esprimono, inoltre, una famiglia di proteine di superficie tra cui MSP130 (Anstrom et al., 1987) e la proteina P16, essenziale per l'allungamento delle spicole (Cheers and Ettensohn, 2005).

Durante le fasi iniziali della morfogenesi scheletrica, in *P. lividus*, *msh130* e *SM50* risultano espressi uniformemente in tutte le PMCs, mentre *sm30* è espresso ad alti livelli nei clusters ventro-laterali (Wolpert and Gustafson, 1967). Inoltre, le PMCs localizzate a livello dei clusters ventro-laterali mostrano un'incrementata espressione di geni marcatori, quali *sm30* e *fgfA*, rispetto alla controparte dorsale (George et al., 1991; Guss and Ettensohn, 1997; Röttinger et al., 2008). Viceversa, queste ultime esprimono un corredo caratteristico di geni, incluso il fattore trascrizionale *tbx2/3*, (Croce et al., 2003). Ciò indica che il mesenchima scheletogenico, analogamente all'ectoderma e ai precursori delle cellule del mesenchima secondario, risulta regionalizzato lungo l'asse D/V (Duboc et al., 2010). Recenti evidenze dimostrano, inoltre, che, in assenza di PMCs, cellule del mesoderma non scheletogenico (SMCs) possono andare incontro ad un processo di trans-differenziamento, contribuendo alla sintesi dello scheletro larvale (Sharma and Ettensohn, 2011). Tale dato completa conoscenze pregresse sul medesimo processo a partire da cellule endodermiche presuntive (McClay and Logan, 1996). Un'interessante ipotesi evolutiva propone che il trans-differenziamento delle cellule delle SMCs ricapitoli un programma ancestrale di scheletogenesi (Erwin and Davidson, 2009; Ettensohn, 2009; Gao and Davidson, 2008). Alla base della riprogrammazione genomica risiede l'impiego regolativo del network delle PMC in cellule non derivate dai micromeri, durante la gastrulazione, che rappresenta un esempio caratteristico di plasticità evolutiva. Ciò richiede l'attivazione ectopica e Pmar1-indipendente del fattore Alx1 (Ettensohn et al., 2007). Tali cellule, inoltre, divengono responsive a segnali regolatori della migrazione cellulare provenienti dai territori ectodermici, recentemente caratterizzati, mediante l'attivazione dei geni *vegfr-10* e *fgfr-2* (Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008).

Studi comparativi hanno rivelato che parte dei geni del network dei micromeri-PMC sono espressi in centri scheletogenici dell'organismo adulto (Gao and Davidson, 2008).

Ciò suggerisce che uno spostamento eterocronico nell'impiego di tale network a livello embrionale abbia coinvolto il reclutamento di componenti regolatori originariamente utilizzati per la scheletogenesi dell'adulto. Connessioni specifiche ed esclusive della fase embrionale si sono evolute successivamente. Differenze maggiori possono essere riscontrate per quanto concerne le basi molecolari della scheletogenesi in echinodermi che hanno evoluto una distinta ontogenia, quali gli organismi caratterizzati da uno sviluppo diretto. È stato, comunque, riscontrato un elevato grado di conservazione del network scheletogenico, anche in specie di riccio di mare evolutivamente distanti (Gao and Davidson, 2008; Yajima, 2007). Ortolghi di geni codificanti per fattori trascrizionali operanti a livello del mesenchima scheletogenico di riccio di mare, risultano similmente espressi, ad esempio, al polo vegetativo di *Asterina miniata*, appartenente alla classe degli Asteroidei, sebbene tale territorio non origini uno scheletro larvale, né siano stati individuati nel genoma ortolghi di *pmar1*. Appaiono, comunque, conservati tra i due *taxa* il subcircuito *hex/erg/tgif* e il circuito a feedback positivo endomesodermico che include i geni *blimp1*, *otx*, *foxa* e *gatae* (Hinman and Davidson, 2007), oltre al meccanismo regolativo della transizione epitelio-mesenchimale. Esclusivamente nel riccio di mare a ciò consegue l'attivazione di un destino scheletogenico delle cellule coinvolte in tale evento (Oliveri et al., 2008). Sulla base di tali evidenze, considerando l'origine mesenchimale dell'endoscheletro larvale e, al contempo, dei centri scheletogenici dell'adulto, è probabile che il network attivo in tali centri si sia evoluto a partire da un network plesiomorfico di geni regolatori del differenziamento endomesodermico (Davidson and Erwin, 2006; McCauley et al., 2010). Pertanto, l'evoluzione molecolare della scheletogenesi embrionale potrebbe risiedere nel reclutamento di nuovi cofattori e nell'instaurarsi di livelli regolativi superiori nell'ambito di subcircuiti conservati (Koga et al., 2010).

Un esempio simile riguarda il reimpiego del subcircuito *patched-hedgehog-engrailed-cubitus interruptus* per stabilire foci di ocelli pigmentati delle ali di alcuni esemplari di farfalla. Tale subcircuito è probabilmente una caratteristica plesiomorfica di un subcircuito trascrizionale operante nel disco imaginale dell'ala d'insetto (Erwin and Davidson, 2009; Keys et al., 1999).

Ulteriori indagini filogenetiche e molecolari, condotte su echinodermi Echinoidei e Ofiuroidei, suggeriscono che l'evoluzione dell'endoscheletro larvale del riccio di mare costituisce un classico esempio di evoluzione convergente, intesa anche in termini di morfologia scheletrica, dipendente da segnali di origine ectodermica (Armstrong et al.,

1993; Di Bernardo et al., 1999; Duloquin et al., 2007; Koga et al., 2010; Rottinger et al., 2008).

### ***1.3.3 Regolazione della morfogenesi scheletrica da parte di segnali di origine ectodermica***

Evidenze antiche sottolineano le basi morfogenetiche e biologiche della migrazione delle PMCs e della scheletogenesi dell'embrione di riccio di mare (Ettensohn, 1990); d'altro canto studi recenti hanno avviato la delucidazione delle basi molecolari di tali processi (Damle and Davidson, 2011; Duloquin et al., 2007; Rho and McClay, 2011; Rottinger et al., 2008; Sharma and Ettensohn, 2010). Prove sperimentali condotte nei primi anni '90, hanno, infatti, consentito di verificare la corretta migrazione di un micromero marcato, iniettato nella cavità blastocelica di un embrione ricevente, ed il contributo dei discendenti di tale cellula alla formazione delle spicole (Ettensohn, 1990). Ciò ha indotto ad ipotizzare che tale informazione posizionale potesse derivare da cellule ectodermiche presuntive. Inoltre, soltanto le PMCs risultavano responsive a tale segnalazione, probabilmente recepita attraverso i filopodi (Malinda et al., 1995; Wu et al., 2007).

Recenti linee di evidenza confermano che la morfogenesi dell'endoscheletro embrionale sia indotta da una segnalazione localizzata, diretta dall'ectoderma alle cellule del mesenchima primario (Cavalieri et al., 2003; Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008). La struttura tridimensionale e la simmetria bilaterale che caratterizzano l'endoscheletro embrionale appaiono determinate dall'organizzazione spaziale che le PMCs assumono all'interno del blastocoele, in stretto contatto con la parete ectodermica, suggerendo che segnali provenienti dall'ectoderma stesso controllino il profilo di migrazione delle PMCs e ne regolino il programma di espressione genica (Duloquin et al., 2007; Ettensohn, 2009; Röttinger et al., 2008). La segnalazione ectoderma-PMCs appare, pertanto, cruciale per il processo di migrazione polarizzata delle PMCs e la regolazione dell'espressione di geni il cui prodotto è coinvolto nel processo di biomineralizzazione. Tale segnalazione influenza, inoltre, la dimensione, il numero e la velocità di crescita delle spicole e, pertanto, la morfologia dello scheletro embrionale (Armstrong et al., 1993; Duloquin et al., 2007; Guss and Ettensohn, 1997; Röttinger et al., 2008). Il trapianto di PMCs esogene nella cavità blastocelica di un embrione

ricevente, infatti, non altera le normali dimensioni dello scheletro larvale, pur risultando in un aumento del numero di precursori scheletogenici ivi presenti (Armstrong et al., 1993; Etensohn, 1990).

Geni differenzialmente espressi nel territorio dell'ectoderma orale sono parte del network di geni regolatori che governa la morfogenesi dell'endoscheletro larvale (Oliveri et al., 2008). La natura molecolare di tali segnali spaziali, forniti dall'ectoderma alle sottostanti PMCs, è rimasta a lungo elusiva, ma nuove informazioni sono state acquisite. È stato riscontrato che la perturbazione funzionale di geni codificanti per molecole secrete e fattori trascrizionali espressi in territorio ectodermico altera il processo di spiculogenesi. Analogamente, il trattamento con  $\text{NiCl}_2$ , che radializza l'embrione, determina lo sviluppo di primordi scheletrici sovranumerari, probabilmente estendendo i segnali spaziali normalmente presenti nelle regioni ventro-laterali dell'embrione (McClay et al., 1992). Tra questi i geni *nectina* (Zito et al., 2000), *nodal* e *bmp2/4* (Duboc et al., 2004), *tbx2/3* (Croce et al., 2003; Gross et al., 2003) e *dri* (Amore et al., 2003) sono primariamente coinvolti nella specificazione di destini cellulari differenti lungo l'asse OAb. Viceversa, il gene con *homeobox otp*, espresso in maniera altamente ristretta nel territorio dell'ectoderma ventro-laterale, è coinvolto fondamentalmente nell'interazione epitelio-mesenchima. A supporto di ciò, allo stadio di mid-gastrula, stadio a cui ha inizio la sintesi scheletrica, *otp* è attivamente trascritto in due coppie di cellule dell'ectoderma orale, distribuite in maniera simmetrica rispetto all'asse destra/sinistra e corrispondenti ai siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs. Anche a stadi tardivi di sviluppo si riscontra una netta corrispondenza tra le cellule esprimenti *otp* e i siti di attiva crescita scheletrica. Tale espressione influenza in maniera specifica il profilo scheletogenico dell'embrione e, a livello molecolare, la trascrizione del marcatore delle PMCs *sm30* (Cavalieri et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999). L'espressione ectopica del messaggero codificante per *otp* determina la radializzazione dello scheletro larvale (Di Bernardo et al., 1999), associata alla comparsa di primordi scheletrici multipli. Viceversa, il blocco della funzione annulla del tutto la sintesi scheletrica (Cavalieri et al., 2003).

Studi recenti dimostrano, poi, che la migrazione direzionale delle PMCs durante la morfogenesi è dipendente dai pathways di segnalazione attivati dai fattori VEGF e FGFA. Come precedentemente accennato, i geni codificanti per tali ligandi sono espressi in regioni localizzate dell'ectoderma in corrispondenza dei siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs, cellule a cui è ristretta l'espressione dei

geni codificanti per i relativi recettori a tirosin chinasi (*vegfr10 e fgfr2*). I due pathways sembrano essere indipendenti e funzionalmente non ridondanti, seppure entrambi essenziali per una corretta morfogenesi scheletrica. In ambedue i casi, infatti, la perdita di funzione del gene determina mancata formazione dello scheletro larvale, fenotipo reciproco rispetto all'espressione ectopica del messaggero corrispondente che determina, invece, un profilo scheletogenico aberrante (Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008). Tra le molecole intracellulari coinvolte nella segnalazione attivata da FgfA, è stato documentato in *P. lividus* un ruolo per Pax2/5/8 nella regolazione della morfogenesi scheletrica (Röttinger et al., 2008), analogamente ad un orologio in organismi vertebrati (Reifers et al., 1998).

Numerosi studi condotti sui vertebrati documentano un effetto chemiotattico diretto di fattori FGF su cellule mesenchimali migratorie. Cellule delle creste neurali mesencefaliche murine risultano attratte da FGF2 e FGF8 (Kubota and Ito, 2000), e i medesimi fattori agiscono da attrattanti per cellule mesenchimali durante lo sviluppo dell'abbozzo dell'arto (Webb et al., 1997) o la formazione delle giunzioni neuromuscolari (Li et al., 2011). La crescita assonica e l'angiogenesi, costituiscono, poi, i migliori esempi di regolazione della migrazione cellulare FGF o VEGF-dipendente (Arima et al., 2011; Dickson, 2002; Fantetti and Fekete, 2011; Ruiz de Almodovar et al., 2011). Inoltre, studi di rilevante interesse suggeriscono un ruolo per il VEGF nella chemio attrazione di cellule stromali di origine mesenchimale verso cellule neoplastiche in pazienti affetti da mieloma multiplo (Xu et al., 2011). Infine, anche in altri sistemi, quali *Xenopus* e *Drosophila* differenti citotipi rispondono mediante recettori a tirosin chinasi a molecole segnale che ne regolano la migrazione (Nagel et al., 2004; Ribeiro et al., 2002; Wang et al., 2010). È stato, infatti, dimostrato che, in *Drosophila*, la morfogenesi del mesoderma implica una transizione epitelio-mesenchimale e la migrazione delle cellule coinvolte è regolata da fattori FGF (Clark et al., 2011).

Tuttavia rimangono ancora incomplete le conoscenze concernenti i meccanismi molecolari responsabili del controllo della migrazione direzionale delle PMCs e il ruolo di ulteriori prodotti proteici potenzialmente coinvolti in tale processo. L'attivazione del programma scheletogenico appare, pertanto, molto più complessa di quanto inizialmente postulato (Sharma and Etensohn, 2010) e i prodotti proteici coinvolti potrebbero avere natura differente.

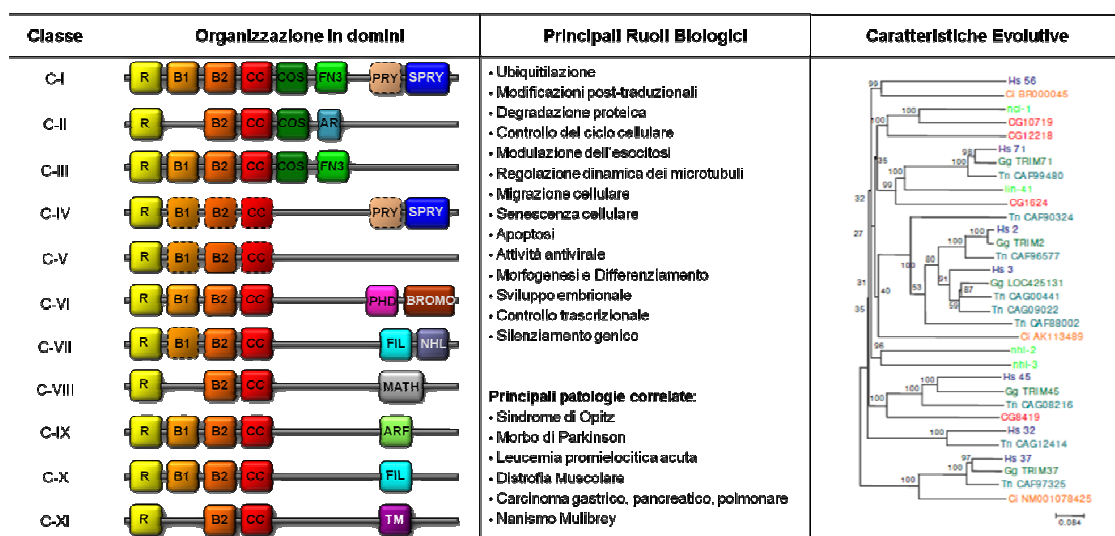
#### **1.4 Le proteine TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox-Coiled coil) e i loro ruoli durante l'embriogenesi**

Nel complesso contesto di un network di geni regolatori dello sviluppo, oltre ai fattori trascrizionali, differenti tipologie di molecole di segnalazione contribuiscono alla complessità regolativa di un determinato processo. In particolare, nell'ambito delle interazioni cellulari, molecole segnale secrete mediano la trasduzione dell'informazione rendendo gli stati genici regolativi dipendenti da stimoli esterni (Duboc et al., 2010). Ruoli pleiotropici sono stati attribuiti a prodotti proteici dotati di domini RING (Really Interesting New Gene) finger. Questi sono coinvolti nella coordinazione di ioni zinco attraverso un motivo definito di residui di cisteina e istidina e assumono una conformazione globulare caratteristica (Deshaies and Joazeiro, 2009; Dikic et al., 2009). È noto in letteratura il coinvolgimento di tali molecole in processi di trasduzione del segnale, interazione proteica e sviluppo embrionale (Grabbe et al., 2011; Weissman, 2001; Weissman et al., 2011). Proteine con dominio RING finger appaiono coinvolte nel mediare il trasferimento di ubiquitina su substrati di diversa natura, determinando, quindi, la regolazione di diversi processi, quali proliferazione cellulare, differenziamento, morfogenesi ed apoptosi (Caratozzolo et al., 2012; Dikic et al., 2009; Jin et al., 2011; Joo et al., 2011; Shen et al., 2011). Recenti dati in letteratura documentano, inoltre, la frequente over-espressione di geni codificanti per RING E3 ubiquitina ligasi in differenti forme di cancro umano; pertanto tali proteine rappresentano, oggi, potenziali bersagli molecolari di interventi terapeutici e potrebbero fungere da marcatori prognostici, sebbene sia stata riscontrata una elevata variabilità in caratteristiche topologiche e di sequenza (Chasapis and Spyroulias, 2009). Un dominio RING finger, seguito da uno o due motivi B-box e da una regione *coiled coil* costituiscono il modulo tripartito caratteristico dei membri della famiglia TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox-Coiled coil). Non si è, ad oggi, pervenuti all'attribuzione di una funzione univoca al motivo B-box, legante zinco, sebbene questo sia probabilmente coinvolto nel mediare interazioni proteiche intermolecolari (Mrosek et al., 2008). Tale ruolo è stato appurato per la regione *coiled-coil* (Hicke and Dunn, 2003; Kawai and Akira, 2011; Napolitano et al., 2011; Reymond et al., 2001).

La famiglia TRIM è stata caratterizzata in dettaglio per quanto concerne il complemento di geni umani, consentendo una sub-classificazione delle proteine da essi codificate



sulla base di domini eventualmente presenti nella regione C-terminale (Carthagen et al., 2009; Han et al., 2011; Ozato et al., 2008; Short and Cox, 2006) (Fig. 7).



**Figura 7. Caratteristiche della famiglia di proteine TRIM/RBCC.** È indicata la classificazione strutturale secondo Carthagen et al., 2009. Quasi tutte le proteine TRIM presentano un dominio RING-finger (R), uno o due domini B-box (B1, B2) e una regione *coiled coil* (CC). Alcuni membri delle singole classi mancano di uno o più domini, indicati con contorno tratteggiato. ACID: regione ricca in amminoacidi acidi; ARF: dominio mediatore di ADP-ribosilazione; BROMO: bromodominio; COS: cos-box; FIL: dominio filamina di tipo I; FN3: fibronectina di tipo III; MATH: dominio con omologia a meprin e TRAF; NHL: dominio NCL1, HT2A e LIN41; PHD: dominio PHD; PRY: dominio pirina; SPRY: dominio SPRY; TM: regione transmembrana. Il cladogramma riporta le relazioni filogenetiche nell'ambito di un sottogruppo di proteine TRIM rappresentate anche negli invertebrati (tratto da Sardiello et al., 2008).

La diversificazione funzionale dei prodotti codificati da tali geni ne riflette l'eterogenea organizzazione strutturale della regione suddetta, oltre a proprietà evolutive distinte (Han et al., 2011; Meroni and Diez-Roux, 2005; Sardiello et al., 2008). Domini PRY, SPRY, B30.2, (PRY-SPRY in successione), NHL (NCL-1, HT2A and LIN41) o MATH (meprin and TRAF homology) eventualmente presenti, mediano interazioni proteina-proteina; i domini COS e FIL (filamin type Ig) sono responsabili, rispettivamente, del legame ai microtubuli e all'actina citoscheletrica, mentre domini FN3 (fibronectin type 3) mediano il legame al DNA e all'eparina. Proteine TRIM appartenenti alla classe VI, presentano, invece, un dominio PHD (plant homeodomain) coinvolto nella regolazione genica mediata da modificazioni della cromatina, che opera in concerto ad un bromo dominio, il quale riconosce residui di lisina acetilati al fine di mediare la repressione trascrizionale. È stata riscontrata, inoltre, la presenza di domini

transmembrana e domini ARF (ADP ribosylation factor like) coinvolti nella regolazione del traffico intracellulare. La classe V, infine, presenta esclusivamente il modulo tripartito (Carthagen et al., 2009; Ozato et al., 2008; Sardiello et al., 2008). In seguito ad eventi di omo-multimerizzazione differenti proteine TRIM identificano compartimenti sub-cellulari distinti. Studi di over-espressione indicano che le proteine TRIM sono prevalentemente localizzate nel citoplasma o nel nucleo, con profili filamentosi, diffusi o a chiazze, sebbene non co-localizzino con marcatori, precedentemente identificati, di compartimenti quali endosomi, mitocondri, apparato del golgi e spliceosoma (Lerner et al., 2007; Reymond et al., 2001). Ad esempio, TRIM19/PML è caratterizzata da localizzazione a livello dei corpi nucleari (Bernardi and Pandolfi, 2007; Jul-Larsen et al., 2010), TRIM1/MID2, TRIM9 e TRIM18/MID1 sono state riscontrate associate ai microtubuli e TRIM13 ha una localizzazione ristretta al reticolo endoplasmatico e al nucleo (Lerner et al., 2007; Short and Cox, 2006).

Numerosi geni codificanti per proteine TRIM/RBCC sono stati individuati in invertebrati e vertebrati superiori ed estese analisi comparative, condotte su differenti sistemi, hanno contribuito a delucidare le basi evolutive di una tale variabilità strutturale e funzionale, che includono, inoltre, eventi di *exon shuffling*, duplicazione e/o delezione genica, eventi di sub-funzionalizzazione e pseudogenizzazione (Boudinot et al., 2011; Han et al., 2011) (Fig. 7). Si tratta, in particolare, di una famiglia genica di antica origine filogenetica, che ha subito notevoli eventi di diversificazione nei vertebrati e, in particolar modo, nei teleostei. In alcuni casi, i geni *trim* risultano associati in clusters nella medesima regione genomica (Meyer et al., 2003; Sardiello et al., 2008). Proteine TRIM coinvolte nell'immunità innata, in particolare nella risposta antivirale, sono state caratterizzate nei teleostei ed in vertebrati superiori (McNab et al., 2011; Munir, 2010; van der Aa et al., 2009). Alterazioni in geni TRIM sono state associate a neoplasie e patologie ereditarie (Hatakeyama, 2011; Herquel et al., 2011; Kudryashova et al., 2009; Sho et al., 2011; Valiyeva et al., 2011). Per alcuni membri della famiglia è stato caratterizzato un ruolo nella regolazione trascrizionale (Bloor et al., 2005; Gilchrist and Adelman, 2010; Yu et al., 2011). In particolare, proteine TIF1 (transcription intermediary factors 1) sono implicate in meccanismi epigenetici di regolazione trascrizionale che coinvolgono modificatori istonici e proteine leganti l'eterocromatina (Beckstead et al., 2005; Torres-Padilla and Zernicka-Goetz, 2006). Più recentemente, sono stati caratterizzati due membri di tale famiglia, NHL-2 in *C. elegans* e TRIM32 nel topo, quali regolatori positivi della funzione di miRNAs, oltre ad essere coinvolti nella

regolazione temporale dello sviluppo, della divisione cellulare asimmetrica e del differenziamento neurale. Le basi molecolari di tali ruoli funzionali risultano ancora speculative, sebbene si abbiano evidenze dell'interazione tra il dominio NHL delle suddette proteine TRIM e membri della famiglia Argonauta, mediatori della funzionalità di miRNAs (Hammell et al., 2009; Loedige and Filipowicz, 2009; Schwamborn et al., 2009; Wulczyn et al., 2011).

Negli ultimi anni è stato documentato il coinvolgimento di proteine TRIM nella regolazione di processi chiave dello sviluppo embrionale. In *Xenopus laevis* la Smad4 ubiquitina ligasi Ectodermina risulta essenziale per la specificazione dell'ectoderma limitando l'attività di induzione mesodermica mediata dai fattori TGF $\beta$  e favorendo l'induzione neurale (Dupont et al., 2009; Dupont et al., 2005); nello stesso modello è stato attribuito un ruolo alla proteina TRIM36 nella somitogenesi e nella determinazione dell'asse dorso-ventrale (Cuykendall and Houston, 2009; Yoshigai et al., 2009). Inoltre, dati in letteratura indicano che la deplezione di Ectodermina in cellule umane rafforza eventi citostatici indotti da fattori TGF $\beta$  e svolge un ruolo causale nel determinare l'effetto antimitogenico di Smad4 in cellule tumorali (Siegel and Massagué, 2003), sebbene esistano differenze tra gli organismi e in distinti stadi di sviluppo. Ne è stato, infine caratterizzato un ruolo quale antagonista di Nodal durante l'embriogenesi murina (Morsut et al., 2010). In tale sistema, inoltre, TRIM63/MURF-1 e TRIM54/MURF3, se alterate, risultano, invece, implicate in processi di atrofia muscolare e sarcopenia, in quanto fisiologicamente coinvolte nella regolazione del differenziamento miogenico (Bodine et al., 2001), in particolare per lo sviluppo cardiaco nel caso di TRIM55/MURF2 (Perera et al., 2011).

Particolarmente interessante e di recente delucidazione è il ruolo della proteina TRIM18/MADD2 nella regolazione di processi di migrazione cellulare orientata durante l'embriogenesi di *C. elegans*. In particolare, TRIM18/MADD2 agisce direzionando cellule muscolari e terminazioni nervose verso gli assoni motori della linea mediana ventrale del nematode, inducendo la formazione della membrana post-sinaptica della giunzione neuromuscolare (Alexander et al., 2010). Nell'uomo, mutazioni nel gene codificante per TRIM18 risultano associate alla sindrome di Opitz, disordine genetico recessivo associato al cromosoma X (De Falco et al., 2003). Dati in letteratura, riportano di un'altra proteina neurospecifica della medesima famiglia, TRIM9, coinvolta nella regolazione dell'esocitosi di cellule neurali in coltura, che risulta repressa nell'encefalo di soggetti affetti da morbo di Parkinson (Berti et al.,

2002; Li et al., 2001; Tanji et al., 2010). Analisi filogenetiche rilevano una elevata conservazione di TRIM 9 anche in organismi invertebrati, quali *C. elegans*, e in *Drosophila* (Short and Cox, 2006). L'osservazione di fenotipi mutanti in tali sistemi ne suggerisce, ivi, un ruolo nella regolazione della crescita assonica (Song et al., 2011).

Molteplici evidenze indicano che il complemento di geni del riccio di mare codificanti per prodotti coinvolti in pathways di segnalazione sia qualitativamente molto simile al repertorio presente nei vertebrati, oltre che in altri organismi invertebrati, e tali geni sono parte di un comune corredo molecolare per la segnalazione intracellulare nei deuterostomi (Lapraz et al., 2006). Non è escluso, pertanto, che membri della famiglia TRIM svolgano ruoli chiave anche durante l'embriogenesi di tale sistema, relativamente al quale non sono presenti, in letteratura, dati funzionali circa prodotti proteici di tale tipologia, ma soltanto sporadiche evidenze *in silico* dell'esistenza di geni per essi codificanti (Hennig et al., 2008).

## SCOPO DEL LAVORO

Dalle osservazioni indicate in letteratura e riportate, in parte, in questo lavoro, si evince il grado di complessità dei meccanismi che regolano lo sviluppo embrionale, e l'intricata architettura genica che ne sta alla base. Pathways molecolari, codificati da networks di geni regolatori, si diramano nelle cellule, svolgendo funzioni multiple nel medesimo organismo e risultando, al contempo, conservati in organismi differenti (Erwin and Davidson, 2009; Peter and Davidson, 2011).

Per quanto concerne il riccio di mare, il sequenziamento del genoma della specie *S. purpuratus* (Sodergren et al., 2006) ha consentito l'annotazione di numerosi geni regolatori, di parte dei quali è stato caratterizzato il profilo spazio-temporale di espressione durante l'embriogenesi e il relativo apparato di *cis*-regolazione (Peter and Davidson, 2009b). Un cospicuo quantitativo di tali dati risulta presente in banche dati di recente implementazione (Wei et al., 2006), oltretutto fruibile per studi comparativi interspecifici. Una caratteristica preminente dell'embriogenesi delle specie di riccio di mare caratterizzate da uno sviluppo indiretto consiste nella biomineralizzazione di un elaborato endoscheletro. Recenti studi hanno rivelato un network di geni regolatori preposto al controllo dello sviluppo del *lineage* dei grandi micromeri scheletrogenici-PMCs (Ettensohn, 2009; Oliveri et al., 2008). Tale network è stato analizzato, inoltre, al fine di delucidare l'evoluzione di programmi di sviluppo e la plasticità dell'embriogenesi. Analisi filogenetiche suggeriscono che l'evoluzione dello sviluppo scheletrico negli echinodermi abbia coinvolto la cooptazione da parte dell'embrione di un network scheletrogenico ancestrale, adulto, attraverso l'invenzione di nuove connessioni regolative (Erwin and Davidson, 2009; Gao and Davidson, 2008). La natura dei segnali regolatori coinvolti in tali interazioni risulta eterogenea, includendo fattori trascrizionali materni e zigotici, molecole di segnalazione paracrina, recettori di membrana e fattori intracellulari (Howard and Davidson, 2004; Peter and Davidson, 2009a). In tale contesto, ruoli pleiotropici sono stati attribuiti a fattori contenenti un dominio RING finger in un modulo tripartito TRIM/RBCC, in organismi superiori e, similmente, in alcune specie di invertebrati (Sardiello et al., 2008). Il presente studio è volto, primariamente, alla caratterizzazione funzionale del gene *strim1* (*sea urchin trim1*), codificante per un membro della famiglia TRIM nella specie mediterranea di riccio di mare, *P. lividus*, integrando approccio computazionale, analisi del profilo

spazio-temporale di espressione e saggi di perturbazione dell'espressione genica. Pertanto, in dettaglio, costituiscono scopo del lavoro:

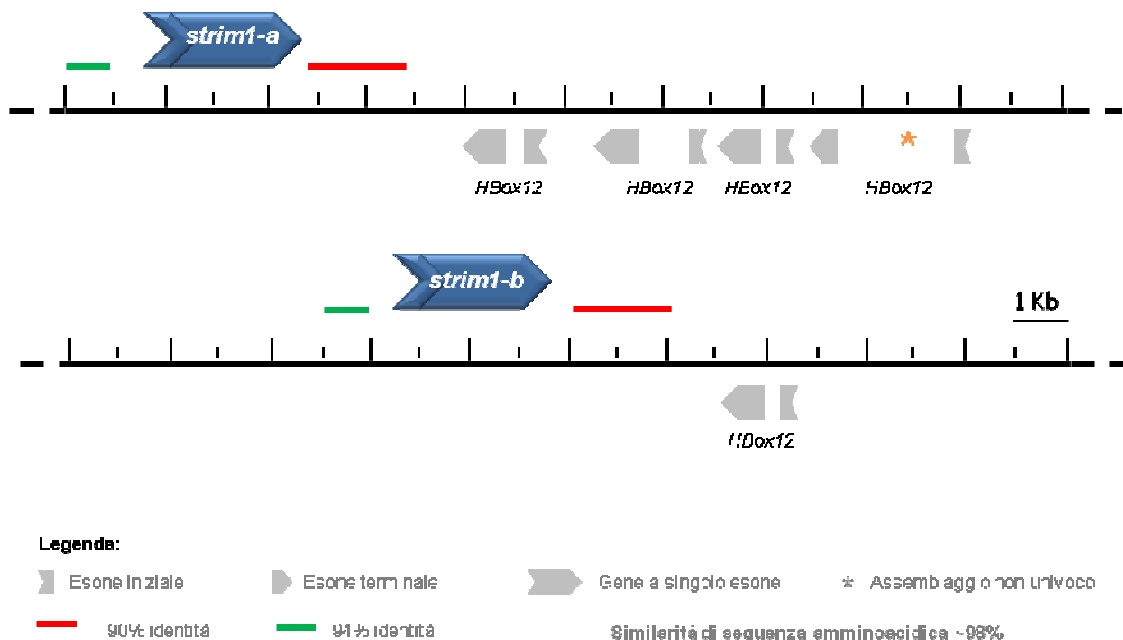
- l'identificazione *in silico* e l'isolamento del cDNA codificante per Strim1, previa caratterizzazione computazionale della struttura *locus* corrispondente e della proteina putativa;
- l'identificazione di un ortologo di *strim1* nel genoma di *S. purpuratus* e la caratterizzazione *in silico* del complemento di geni contenenti *trim box* in quest'ultima specie;
- l'analisi del profilo spaziale e della finestra temporale di espressione di *strim1* durante l'embriogenesi;
- l'analisi funzionale mediante esperimenti di over-espressione del mRNA codificante per Strim1 e saggi di perdita di funzione;
- l'individuazione di bersagli molecolari, diretti o indiretti, di Strim1.

Al fine di rendere l'analisi esaustiva è obiettivo del lavoro, inoltre, uno studio funzionale parallelo sul promotore del gene in esame. Ciò al fine ultimo di delineare ipotetiche interazioni combinatoriali nell'ambito di subcircuiti del network di geni regolatori dello sviluppo, ed, in particolare di geni preposti alla regolazione della morfogenesi scheletrica, correlando aspetti morfofunzionali e relativi determinanti molecolari.

## RISULTATI

### 2.1 Struttura genomica del locus *strim-1*

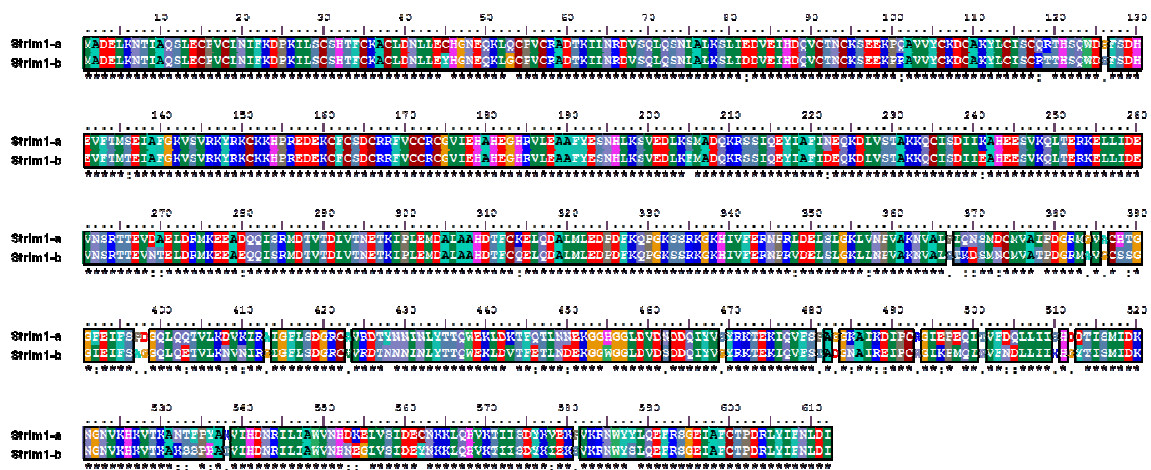
Nell'ambito di uno studio *in silico* finalizzato alla caratterizzazione del cluster di geni codificanti per il repressore trascrizionale Hbox12 nel genoma di *P. lividus*, è stato ricostruito un segmento genomico di 72832 bp. Esso comprende copie multiple del gene *Hbox12*, parte delle quali ripetute in tandem. L'analisi predittiva *ab initio*, condotta mediante impiego del software Genscan, ha indicato due geni putativi, uno all'interno di una regione di circa 21 kb tra la quarta e la quinta copia del gene *Hbox12* e l'altro in una regione di oltre 28 Kb a valle della settima (Fig. 1).



**Figura 1. Struttura putativa del segmento genomico contenente i geni codificanti per Hbox12 e Strim1, predetta dal software Genscan.**

Entrambi i geni, probabilmente originati da un evento di duplicazione, sono privi di introni, poiché constano di un singolo esone di 1839 bp, e sono trascritti nella medesima direzione, opposta rispetto al senso di trascrizione delle copie geniche codificanti per *Hbox12*. Mediante ricerca *in silico* con impiego del software TESS (Transcription element search system) è stata individuata una TATA box canonica putativa a monte del sito di inizio putativo di trascrizione. I due geni presentano un'identità di sequenza

nucleotidica pari al 93% nella regione codificante; essa si riduce all'88.8 % nella regione del promotore, seppur con segmenti di identità pari al 94%; la regione 3' delle due copie geniche mostra un'identità media del 90%. In particolare, le regioni di sequenza caratterizzate da maggiore identità a livello del promotore putativo appaiono contigue sulla seconda copia genica ed intervallate da regioni non conservate sulla prima, come ulteriormente confermato dall'analisi comparativa mediante il software Vista. Entrambi i geni codificano per una proteina predittiva che mostra similarità reciproca pari a circa il 98% (Fig. 2). La ricerca in banche dati ha rivelato una notevole similarità con membri della famiglia TRIM/RBCC (Tripartite motif/RING-Bbox-Coiled coil).



**Figura 2. Allineamento delle sequenze amminoacidiche del prodotto proteico putativo dei geni *trim1* mediante il software ClustalW. I residui identici sono indicati con un asterisco. : e . indicano un grado di conservazione decrescente. Residui amminoacidici divergenti sono indicati da spazi bianchi.**

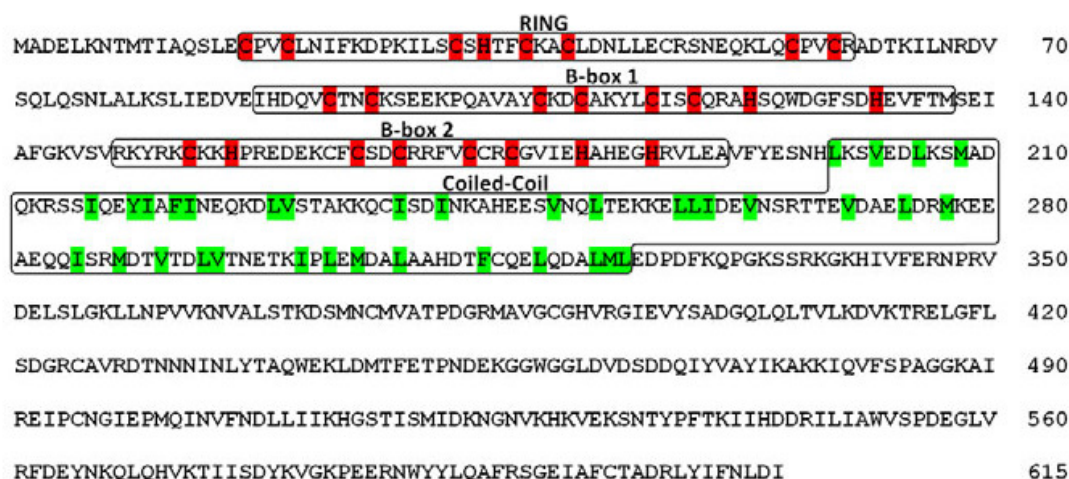
Tali proteine, coinvolte in diversi processi cellulari, fisiologici e patologici (Hatakeyama, 2011; Meroni and Diez-Roux, 2005; Munir, 2010), presentano una struttura modulare caratteristica consistente di un dominio RING finger, sottotipo C2, all'estremità ammino-terminale della proteina putativa, seguito dai due motivi leganti zinco B-box1 e B-box2 e da una regione *coiled coil*, ricca in amminoacidi idrofobici, cui può seguire un ulteriore dominio nella regione C-terminale della proteina. In particolare, il sottotipo C2 di domini RING finger, definito dalla presenza di una cisteina a livello del quinto sito di coordinazione dello zinco (Freemont, 2000), è riscontrabile in proteine della famiglia TRIM/RBCC.



## 2.2 Clonaggio e analisi di sequenza del cDNA codificante per *Strim1*

Combinando l'approccio computazionale alla tecnica di RT-PCR è stato isolato un cDNA di 1860 bp, di cui è stata validata la sequenza.

La ricerca di similarità con proteine note, associata all'analisi strutturale predittiva della proteina putativa, di 615 residui amminoacidici, codificata da tale cDNA, ne ha suggerito l'appartenenza alla famiglia TRIM/RBCC, diffusa tra gli organismi eucarioti. È individuabile un caratteristico dominio RING finger, seguito dai due motivi leganti zinco, B-box1 e B-box2, e da una regione *coiled coil* ricca in amminoacidi idrofobici. Nessun altro dominio è stato rilevato nella regione codificante per la porzione C-terminale della proteina putativa. Pertanto, sulla base di una recente sub-classificazione del corredo di proteine TRIM umane (Carthagen et al., 2009; Short and Cox, 2006), il prodotto codificato dal cDNA in esame è ascrivibile alla classe V, che include proteine con dominio TRIM completo o incompleto ma prive di domini C-terminali. Il dominio RING finger è definito dalla *consensus* C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(9-39)</sub>-C-X<sub>(1-3)</sub>-H-X<sub>(2-3)</sub>-C/H-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(4-48)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C, in cui residui di cisteina e istidina fungono da siti di coordinazione per due atomi di zinco. I domini B-box1 e 2 sono definiti rispettivamente dalle *consensus*, C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(7-12)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>2</sub>-C/H-X<sub>(3-4)</sub>-H-X<sub>(4-9)</sub>-H e C-X<sub>2</sub>-H-X<sub>(7-9)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C/D/H/E-X<sub>4</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(3-6)</sub>-H-X<sub>(2-5)</sub>-C/H (Fig. 3). Il dominio B-box2, in particolare appare caratteristico della famiglia TRIM. Sulla base delle analisi computazionali appena descritte il gene individuato in *P. lividus* è stato denominato *strim1* (sea urchin *trim 1*).



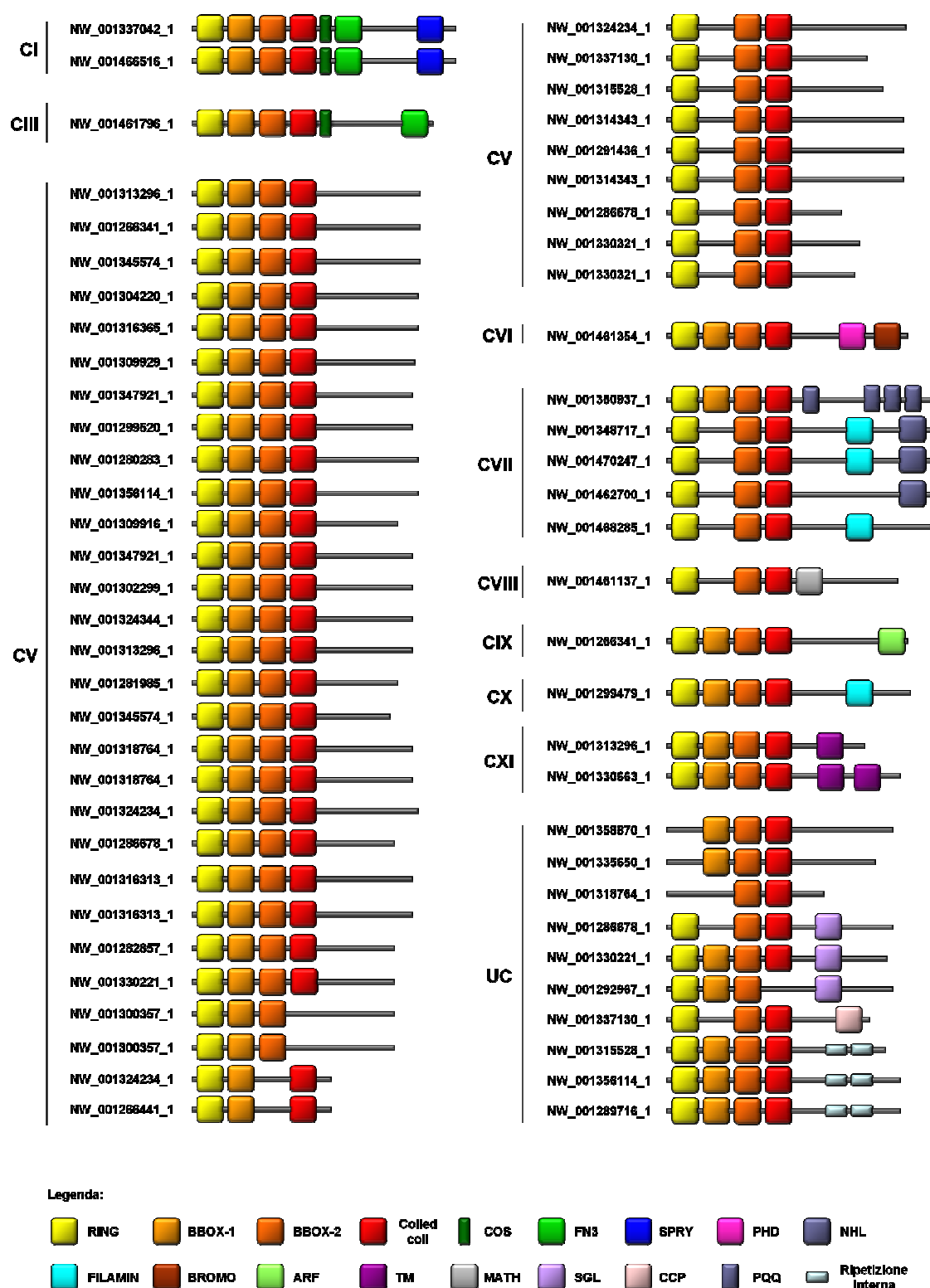
**Figura 3. Sequenza amminoacidica predetta di Strim1.** I residui leganti zinco del dominio RING finger N-terminale e dei due domini B-box sono evidenziati in rosso. Residui idrofobici della regione *coiled coil* sono evidenziati in verde.

### 2.3 Il complemento di geni contenenti trim box in *S. purpuratus*

Data l'assenza di studi in letteratura sui geni codificanti per componenti della famiglia *trim* in riccio di mare, è stata condotta un'analisi mirata all'identificazione di un ortologo di *strim1* in *S. purpuratus*. Di tale specie di riccio di mare è nota la sequenza genomica, e ciò consente studi *in silico* non attuabili per la specie *P. lividus*. L'impiego dell'approccio genomico ha consentito di definire l'intero complemento di geni contenenti *trim box* in *S. purpuratus*. Inoltre, i prodotti proteici codificati dai geni individuati sono stati catalogati secondo la recente classificazione delle proteine TRIM umane (Carthagen et al., 2009) (Fig. 4).

In particolare è stata condotta un'estesa ricerca sulla banca dati genomica di *S. purpuratus* utilizzando, alternativamente, come *query* la sequenza del cDNA codificante per *Strim1* o il complemento di sequenze TRIM umane note (Sardiello et al., 2008), e integrando i risultati ottenuti. L'impiego reiterato dell'algoritmo Blast, nelle varianti TBlastX, TBlastN, Blastp e PSI-Blast, e del software Genscan, ha consentito la caratterizzazione dei loci potenzialmente codificanti per proteine TRIM in riccio di mare.

I risultati ottenuti indicano la presenza di copie geniche multiple, in *S. purpuratus* e, potenzialmente in *P. lividus*, localizzate in regioni genomiche distinte ed eterogenee, sia per quanto concerne l'intorno genico delle putative sequenze codificanti per proteine TRIM, che, probabilmente, per l'assetto cromatinico (Fig. 5). Ciò concorda con la natura multigenica della famiglia TRIM in esame, descritta in letteratura (Sardiello et al., 2008). L'esito dell'analisi comparativa condotta è rappresentato da oltre 60 copie distinte di geni putativi caratterizzati da identità media pari al 75% a segmenti corrispondenti alla regione codificante di *strim1*. La quasi totalità di tali geni presenta in *S. purpuratus* la medesima organizzazione strutturale descritta in *P. lividus*, risultando privi di introni. Si sono riscontrati rari casi in cui regioni di sequenza non nota, o contig derivanti da assemblaggio non univoco sono state interpretate dal software come introni. Un'esame critico e accurato ha evitato deduzioni non corrette. Sono stati individuati casi di geni putativi contenenti *trim box* presenti in duplice copia, nello stesso locus o in locus differenti. Le rimanenti sequenze analizzate mostrano un grado di identità reciproca inferiore, tale da suggerire che possano essere presenti nel genoma in singola copia.



**Figura 4.** Schematizzazione del complemento di proteine TRIM putative in *S. purpuratus*, ordinate secondo la classificazione di Cartaghena et al., 2009. ARF: dominio mediatore di ADP-ribosilazione; BROMO: bromodominio; COS: cos-box; FIL: dominio filamina di tipo I; FN3: fibronectina di tipo III; MATH: dominio con omologia a meprin e TRAF; NHL: dominio NCL1, HT2A e LIN41; PHD: dominio PHD; PRY: dominio PRY ; SPRY: dominio SPRY; TM: regione transmembrana.

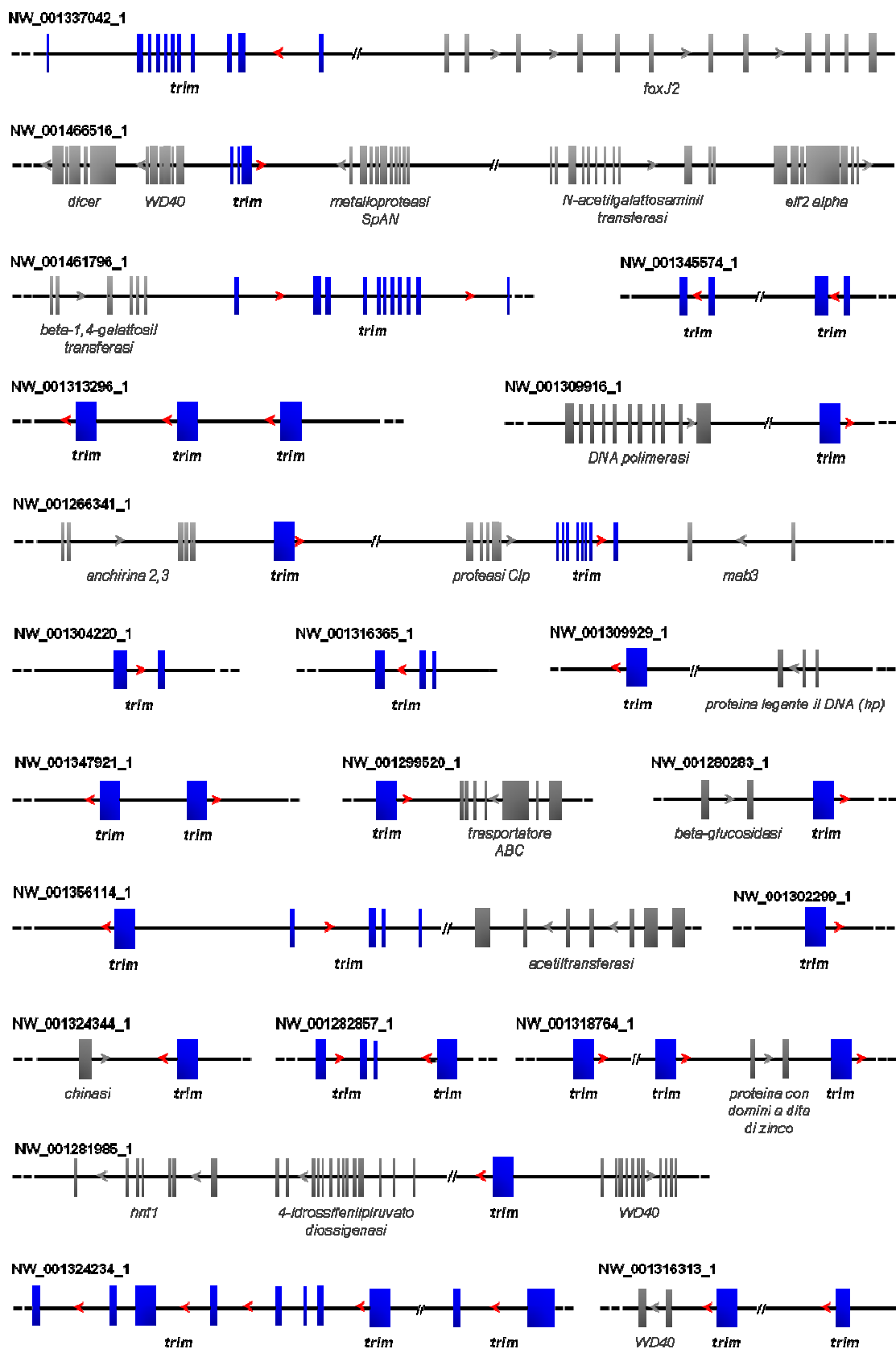
Le copie geniche sopra indicate corrispondono prevalentemente a trascritti di dimensioni comprese tra 1710 e 1860 bp e prodotti peptidici di dimensioni comprese tra 570 e 620 residui amminoacidici, rientrando, pertanto, nel medesimo ordine di grandezza di Strim1 di *P. lividus*.

Nel corso del medesimo studio comparativo sono stati individuati ulteriori geni putativi, di cui parte a singolo esone ed alcuni con uno o più introni, caratterizzati da un elevato grado di identità a *strim1* a livello genico ed a livello proteico, sebbene le dimensioni sia dei messaggeri presuntivi che dei peptidi predittivi non risultino paragonabili.

La presenza sulla sequenza amminoacidica di domini caratteristici della famiglia proteica in esame è stata valutata mediante opportuni strumenti di predizione. Sono state individuate proteine TRIM, complete e incomplete, ascrivibili alle medesime classi individuate per le proteine umane della stessa famiglia (Carthagen et al., 2009), eccetto la classe II. Sono, comunque, presenti prevalentemente proteine prive di domini C-terminali. Sono state, inoltre individuate putative TRIM caratteristiche di riccio di mare o, comunque non presenti in vertebrati superiori.

Come indicato in precedenza, la proteina putativa codificata da *strim1* di *P. lividus* è ascrivibile alla classe V delle proteine TRIM umane, dotate di motivo TRIM completo e assenza di domini C-terminali. Pertanto, è stata focalizzata l'attenzione sulle proteine di *S. purpuratus*, appartenenti alla medesima classe e il cui corredo è attualmente completo. In particolare, la classe V, in *S. purpuratus*, risulta suddivisibile in due sottogruppi principali, escludendo due proteine caratterizzate da un maggior livello di divergenza.

L'analisi comparativa intraspecifica, mediante allineamento di sequenza, e l'analisi filogenetica, hanno evidenziato, parallelamente ad un elevato livello di similarità globale, differenze nella sequenza amminoacidica dei domini costituenti il modulo tripartito, e, in misura maggiore, a livello delle regioni spaziatrici e C-terminale. Il primo sottogruppo è costituito da 11 membri, il secondo ne comprende 21. Sono stati riscontrati casi di prodotti codificati da geni duplicati in ciascun gruppo. Questi non sono stati inclusi nelle analisi successive.



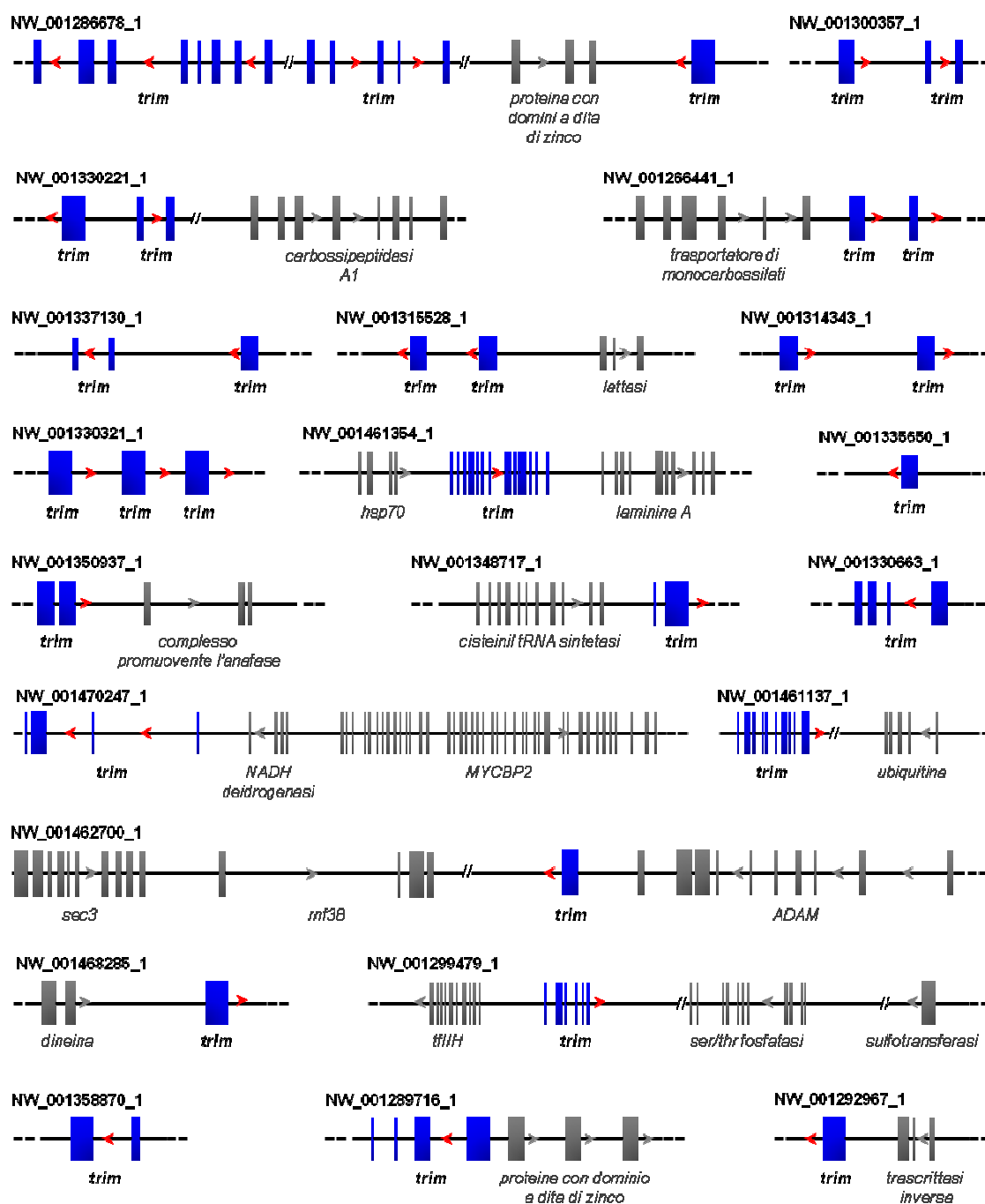


Figura 5. Schema riassuntivo della struttura di segmenti dei contigs relativi a regioni del genoma di *S. purpuratus* contenenti geni *trim* putativi (in blu), individuati durante l'analisi comparativa. Ciascun gene è indicato con il nome del prodotto putativo per cui codifica. Le frecce ne indicano il senso di trascrizione.

L'allineamento multiplo delle relative sequenze amminoacidiche, esteso all'intero prodotto proteico, rivela una similarità reciproca superiore al 75% e che raggiunge, in alcuni casi, l'88-90%. Il grado di similarità reciproca appare ancora più elevato nel caso di allineamento multiplo della sola regione corrispondente al motivo tripartito o ai singoli domini costituenti (Fig. 6).

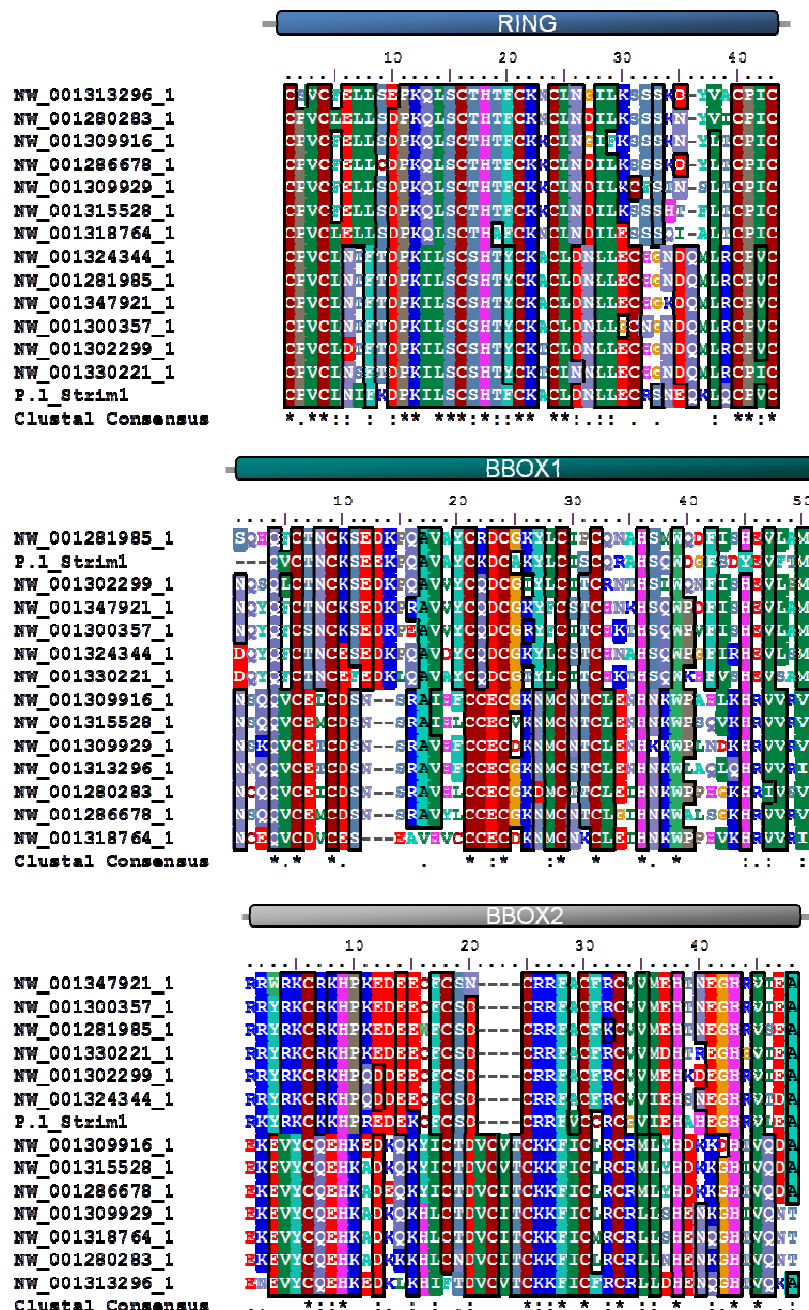
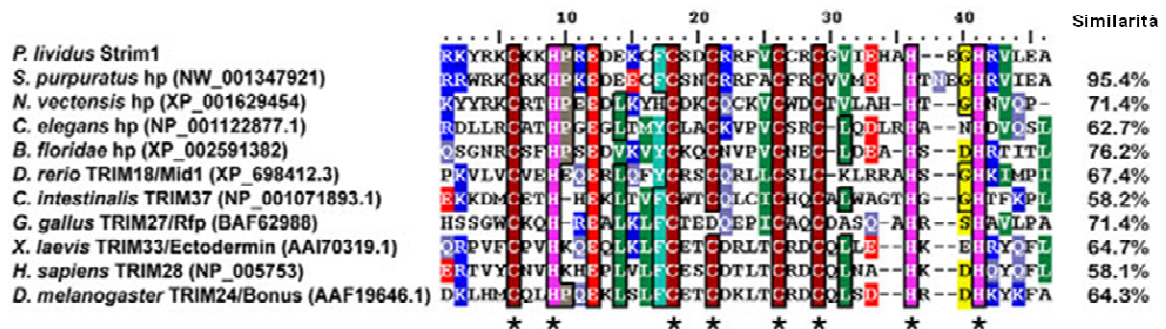


Figura 6. Allineamento multiplo dei domini costituenti il motivo tripartito di Strim1 e proteine simili in *S. purpuratus* (RING finger; Bbox1; Bbox2). I residui identici sono indicati con un asterisco. : e . indicano un grado di conservazione decrescente. Residui amminoacidici divergenti sono indicati da spazi bianchi.

Le sequenze del motivo TRIM, in particolare, mostrano un grado di similarità spesso superiore all'80% con la sequenza amminoacidica corrispondente di Strim1 di *P. lividus*. Oltre alle caratteristiche di sequenza, appaiono spesso conservate le dimensioni dei singoli domini costituenti e la spaziatura tra di essi, intesa in numero di residui amminoacidici.

Un confronto interspecifico tra le sequenze amminoacidiche dei domini costituenti il modulo tripartito di Strim1 di *P. lividus* e delle proteine TRIM ad essa maggiormente simili di organismi differenti lungo la scala evolutiva, mostra invece un maggior grado di diversificazione, parallelamente all'elevata conservazione di residui chiave in ciascun dominio (Fig.7).



**Figura 7. Allineamento multiplo dei domini Bbox2 di proteine TRIM di organismi differenti.** Sulla destra è riportato il grado di conservazione, espresso come percentuale di similarità. I residui coinvolti nella coordinazione di atomi di zinco, conservati in tutte le sequenze, sono indicati da un asterisco.

Complessità numerica e strutturale, diversificazione funzionale e rapidità evolutiva caratterizzanti i geni *trim* hanno reso, comunque, difficile l'individuazione di ortologhi di *strim1*.



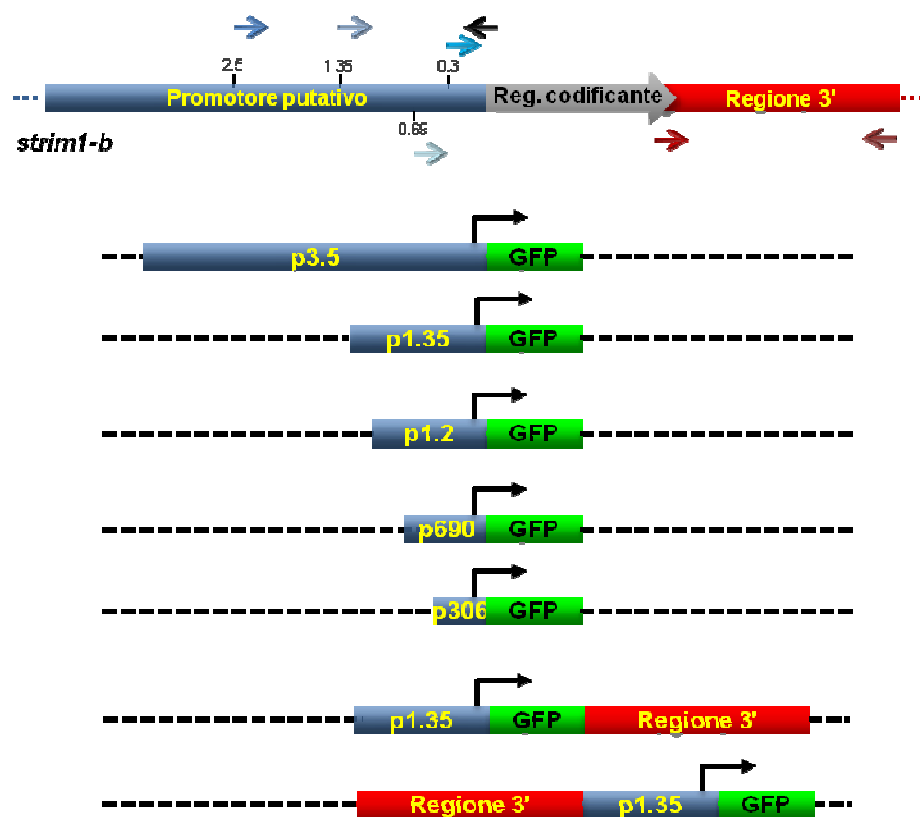
#### **2.4 L'analisi comparativa rivela siti di legame per fattori di trascrizione conservati tra i promotori dei geni contenenti trim box in *S. purpuratus***

La suddivisione in sottogruppi sulla base delle caratteristiche di sequenza amminoacidica appare sovrapponibile alla medesima classificazione attuata considerando l'identità a livello genico. In nessun caso, però, un'analisi comparativa interspecifica tra i promotori putativi dei geni in esame di *S. purpuratus*, e i promotori putativi delle due copie geniche di *strim1* in *P. lividus*, ha palesato rapporti di omologia, nonostante l'elevata similarità tra i prodotti proteici corrispondenti. Pertanto, è stata condotta una ricerca computazionale di regioni di sequenza filogeneticamente conservate, contenenti elementi putativi di *cis*-regolazione, estesa al corredo completo di geni contenenti *trim box* in *S. purpuratus*. Tale approccio appare applicabile nel caso di specie evolutivamente distanti e risulta particolarmente valido ai fini della comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica, durante lo sviluppo embrionale, e di eventi di evoluzione molecolare (Brown, 2008; Ho et al., 2009).

Non essendo stati riscontrati rapporti di omologia evidenti, è stata intrapresa un'analisi intraspecifica fine volta a rilevare la conservazione di siti di legame per fattori di trascrizione tra i promotori dei geni in esame. L'analisi predittiva integrata, mediante impiego degli strumenti TESS e Family Relation II, ha consentito l'identificazione di siti, potenzialmente coinvolti nella *cis*-regolazione dell'espressione genica, condivisi da promotori di geni dello stesso sottogruppo. Ordine, spaziatura e orientamento di tali siti appaiono conservati, suggerendo moduli putativi localizzati in una regione di circa 2 Kb a monte del sito di inizio putativo di trascrizione dei geni in esame. In particolare, un modulo di circa 150 bp è chiaramente rilevabile a livello di tutti i promotori putativi dei geni appartenenti al primo sottogruppo. Esso include siti predittivi di legame per i fattori GATA, Ets, NFμE3 e fattori leganti sequenze CAC. Per quanto concerne i promotori di geni appartenenti al secondo sottogruppo, la natura dei siti presenti appare maggiormente eterogenea, seppur con notevole ridondanza di siti GATA, Ets, NF1 e Myb. I dati non risultano, comunque, traslabili sulla sequenza del promotore delle due copie del gene *strim1* di *P. lividus*. La validazione funzionale dei siti putativi di *cis*-regolazione sarebbe necessaria al fine di eliminare casi di falsa positività, sebbene i risultati ottenuti abbiano un elevato potere speculativo, associati ai risultati relativi al profilo spazio-temporale di espressione di *strim1* ed alla sua perturbazione, e integrati dalle conoscenze riportate in letteratura sulle caratteristiche della famiglia dei geni *trim*.

## 2.5 Analisi dell'apparato di cis-regolazione del gene *strim1*

Considerati i risultati sin qui descritti, l'approccio sperimentale è apparso necessario al fine di studiare la *cis*-regolazione del gene di interesse. Sono state, pertanto ingegnerizzate costruzioni promotore-reporter (*Green Fluorescent Protein (GFP)*) per saggi di trasferimento genico, mediante amplificazione. Data la presenza di siti di assemblaggio non univoco all'interno del promotore putativo della prima copia genica, sono state ingegnerizzate costruzioni promotore-reporter contenenti regioni di sequenza esclusivamente derivanti dalla seconda copia genica (Fig. 8).



**Figura 8. Rappresentazione grafica della struttura genomica di *strim1* (in alto) e delle costruzioni promotore-reporter ingegnerizzate (in basso). Frecce di colore differente indicano gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione delle regioni di interesse.**

L'amplificazione dei frammenti di interesse è stata condotta a partire da DNA genomico di 4 individui distinti e le costruzioni sono state sottoposte a sequenziamento, verificando l'identità del segmento di promotore clonato con il promotore putativo di

*strim1*. Durante la fase di ingegnerizzazione delle costruzioni suddette è stato verificato l'elevato grado di variabilità genomica che caratterizza i geni *trim*, anche in *P. lividus*. Mediante l'impiego della medesima coppia di oligonucleotidi, infatti, mappanti in corrispondenza dell'estremità 5' della regione codificante di *strim1* e 2.5 Kb a monte del sito di inizio putativo della trascrizione, è stata effettuata l'amplificazione di frammenti di dimensioni differenti da quelle attese, a partire da campioni distinti di DNA genomico. Accurate analisi di sequenza hanno evidenziato che la regione di variabilità si estende oltre 1.35 kb dal sito di inizio putativo della trascrizione. Inoltre, come indicato da analisi comparative, le due copie del gene *strim1* individuate in *P. lividus* presentano regioni di sequenza caratterizzate da maggiore identità, a livello del promotore putativo, che risultano contigue sulla seconda copia genica ed intervallate da regioni non conservate sulla prima. A differenza di quanto osservato per le regioni del promotore, le regioni 3' dei geni in esame appaiono all'analisi *in silico*, maggiormente conservate.

Tutte le costruzioni promotore-GFP suddette sono state saggiate in esperimenti di trasferimento genico, previa linearizzazione. Gli embrioni sono stati sottoposti ad attenta osservazione in microscopia a fluorescenza, durante lo sviluppo, ma in nessun caso è stata visualizzata l'espressione del gene reporter. È stata, dunque, ipotizzata l'esistenza di complessi meccanismi di regolazione dell'espressione di *strim1* o l'ipotesi alternativa che la copia genica considerata non sia funzionante durante lo sviluppo embrionale.

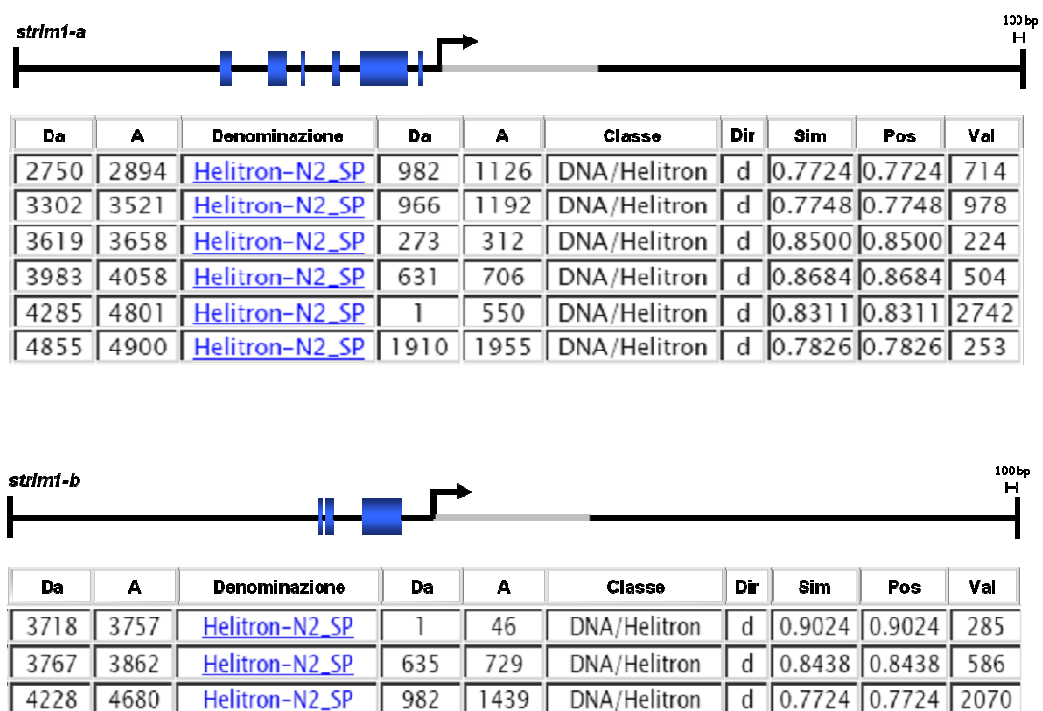
## ***2.6 Il promotore delle due copie del gene *strim1* contiene l'elemento trasponibile *Helitron-N2****

Alla luce dei risultati ottenuti è stato condotto un attento studio bioinformatica delle sequenze dei promotori putativi delle due copie del gene *strim1*. È noto in letteratura che caratteristiche di sequenza, quali un elevato contenuto in GC, presenza di brevi regioni ripetute ed elementi trasponibili promuovono il silenziamento genico (Eike et al., 2005). Studi recenti suggeriscono, inoltre, eventi di trascrizione tessuto specifica da elementi trasponibili, durante lo sviluppo embrionale (Faunes et al., 2011). Pertanto, il software Censor è stato utilizzato per identificare e visualizzare graficamente la distribuzione degli elementi trasponibili e delle regioni ripetute presenti sulle sequenze di interesse (Fig. 9). Tale strumento, paragona la sequenza di interesse con un database di riferimento di elementi di DNA ripetuto (RepBase) (Kohany et al., 2006), completo e costantemente aggiornato. In figura è mostrato un estratto del risultato della suddetta analisi, corrispondente ad un resoconto dettagliato delle regioni ripetute individuate, rispettivamente, sulla prima (a) e sulla seconda copia genica di *strim1* (b). È evidenziata in rosso la regione codificante di ciascun gene. Con particolare interesse è stata individuata, a livello del promotore putativo di entrambe le copie di *strim1*, la presenza di regioni di sequenza con elevata identità a segmenti dell'elemento trasponibile *Helitron-N2*. Gli *Helitrons* si identificano con una delle principali classi di trasposoni eucariotici, individuati in differenti specie, dai protisti ai mammiferi. La classe include elementi autonomi e non autonomi, caratterizzati da trasposizione semireplicativa, il cui meccanismo non è stato ancora del tutto elucidato, e che appaiono coinvolti in eventi di cattura genica (Kapitonov and Jurka, 2007; Kapitonov and Jurka, 2008). In particolare, studi *in silico*, indicano che sequenze *Helitrons*, costituiscono circa l'1% del genoma di riccio di mare (Kapitonov and Jurka., 2005). Inoltre, differenti classi di RNA non codificanti sono state recentemente oggetto di studi analoghi e programmi di sequenziamento concernenti il network trascrizionale durante l'embriogenesi precoce del riccio di mare (Kadri et al., 2011; Wei et al., 2011b). In particolare sono stati individuati *piwi*RNAs putativi con sequenze complementari a numerosi trasposoni e retrotrasposoni (Wei et al., 2011b).

Il software Censor ha rilevato la presenza di 6 regioni, di dimensioni differenti, corrispondenti a segmenti di sequenza dell'*Helitron-N2* in una zona compresa tra 105 bp e 2255 bp a monte del sito di inizio putativo della trascrizione su *strim1a*. Un esame accurato delle regioni interposte tra i frammenti di trasposone predetti, ha consentito di

ricostruire l'intero *Helitron-N2* sulla sequenza del promotore della prima copia genica di *stim1*. Per quanto concerne *stim1b*, sono state individuate 3 regioni, corrispondenti a segmenti di sequenza dell'*Helitron-N2* in una zona compresa tra 321 bp e 1283 bp a monte del sito di inizio putativo della trascrizione. Anche in questo caso le regioni interposte presentano un certo grado di identità con frammenti di sequenza di *Helitron-N2*, sebbene inferiore rispetto a *stim1a*, e tale, pertanto, da suggerire eventi di delezione, successivi alla trasposizione, a livello del promotore di *stim1b* (Fig. 9).

I risultati appena descritti suggeriscono, dunque, una spiegazione alla mancata espressione *in vivo* del gene reporter delle costruzioni ingegnerizzate, oltre a motivare le difficoltà incontrate nell'analisi comparativa per l'identificazione di un ortologo di *stim1*. Una dettagliata analisi a riguardo, per quanto rilevante, comunque, esula dal presente studio, volto primariamente ad analisi di natura funzionale e all'eventuale individuazione di interconnessioni tra pathways, la quale potrebbe contribuire alla comprensione delle basi molecolari di processi fisiologici durante l'embriogenesi.

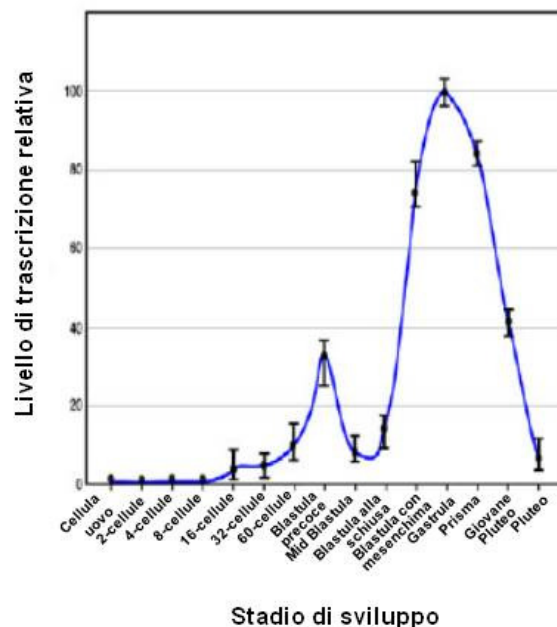


**Figura 9. Estratto del risultato dell'analisi effettuata mediante il software CENSOR sul promotore di entrambe le copie di *stim1*.** In tabella è indicato (nell'ordine): la posizione del trasposone sulla sequenza in input, la denominazione dello stesso, la regione della consensus dell'elemento ripetuto che mostra identità con la sequenza *query*, la classe di appartenenza, il valore di similarità tra i due frammenti allineati il punteggio attribuito a tale allineamento. È mostrata, inoltre, una rappresentazione schematica della sequenza dei due geni di interesse. La regione codificante è indicata in grigio. La freccia indica il sito di inizio putativo di trascrizione. Rettangoli blu identificano segmenti di *Helitron-N2* e ne riproducono la localizzazione sul il promotore di *stim1*.

### 2.7 *strim1* è caratterizzato da due fasi di espressione durante lo sviluppo embrionale

Dati dettagliati concernenti il profilo di espressione temporale del gene *strim1*, durante l'embriogenesi, sono stati conseguiti mediante analisi Real Time PCR quantitativa (Q-PCR), a partire da RNA totale estratto da embrioni a differenti stadi di sviluppo (cellula uovo, 2, 4, 8, 16, 32 e 60 blastomeri, blastula precoce, mid-blastula, blastula alla schiusa, blastula con mesenchima, gastrula, prisma, giovane pluteo e pluteo). *strim1* non risulta essere un trascritto materno, ma segue un profilo di espressione zigotico rilevabile già allo stadio di 16 blastomeri e che rimane pressoché costante durante gli stadi immediatamente successivi. È, poi, possibile individuare due picchi di espressione durante le fasi di segmentazione e gastrulazione, di cui il picco massimale si riscontra in corrispondenza degli stadi di gastrula e prisma, conseguentemente ad un rapido incremento che ha inizio durante la fase di ingressione del mesenchima primario. Un livello trascrizionale inferiore è rilevabile allo stadio di pluteo (Fig. 10).

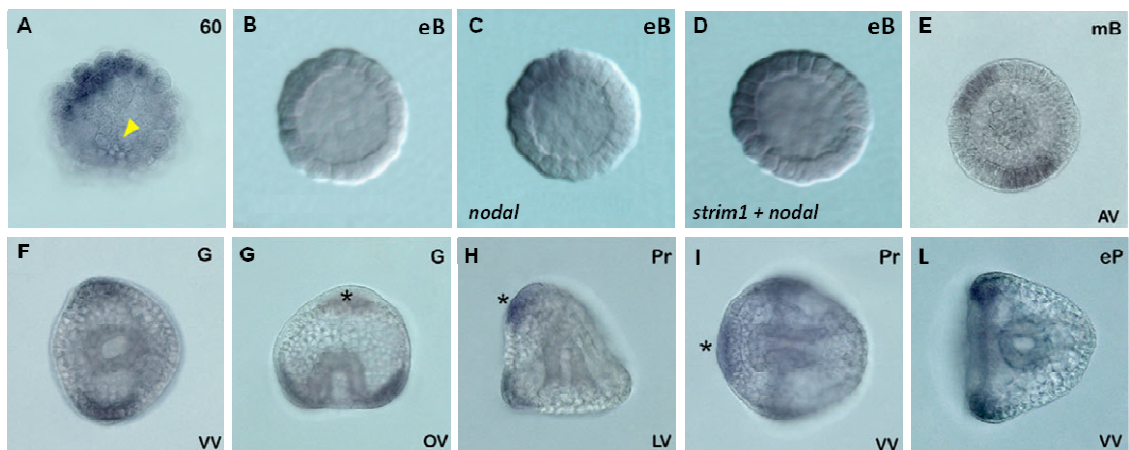
L'analisi mediante Q-PCR, ha così consentito di rilevare i trascritti *strim1* anche a stadi di sviluppo molto precoci, in cui non risultano rilevabili mediante ibridazioni in situ su embrioni interi (WMISH).



**Figura 10.** Profilo di espressione temporale di *strim1* durante l'embriogenesi di *P. lividus*, valutato mediante Real-Time PCR Quantitativa. I valori a differenti stadi di sviluppo sono mostrati come percentuale dell'intensità massima di segnale.

## 2.8 I trascritti di *strim1* presentano un profilo di localizzazione spaziale ristretto a cellule dell'ectoderma orale

La distribuzione dei trascritti derivanti dal gene *strim1* di *P. lividus* è stata valutata mediante ibridazioni in situ su embrioni interi (WMISH), previo isolamento e clonaggio molecolare del frammento di cDNA corrispondente al messaggero completo di 1860 bp, da cui è stata trascritta *in vitro* una sonda antisenso marcata con digossigenina. È stata riscontrata un'espressione localizzata, animale e laterale, del gene di interesse a stadi precoci di sviluppo. Tale profilo appare chiaramente distinguibile in un embrione allo stadio di 60 cellule (Fig. 11 A) e si mantiene allo stadio di blastula, sebbene risulti complesso distinguere i citotipi coinvolti dall'espressione del gene sulla base di caratteristiche puramente morfologiche (Fig. 11 B). Sulla base dei risultati ottenuti a stadi tardivi si può concludere che la localizzazione dei trascritti sia limitata ai territori dell'ectoderma orale presuntivo. Inoltre, mediante WMISH è stato verificato che, allo stadio di blastula, la localizzazione dei trascritti *strim1* si sovrappone ampiamente a quella dei trascritti *nodal* (Duboc et al., 2004), marcatore della regione orale dell'embrione (Fig. 11 C,D).



**Figura 11. Profilo di localizzazione dei trascritti *strim1* a differenti stadi di sviluppo, rivelato mediante ibridazioni in situ su embrioni interi.** La freccia in A indica i micromeri, gli asterischi in G, H e I indicano il dominio animale di espressione di *strim1*. In D doppia ibridazione *in situ* con sonde per *strim1* e *nodal*. 60: embrione allo stadio di 60 cellule; eB: blastula precoce; mB: blastula con mesenchima; G: gastrula; Pr: prisma; eP: giovane pluteo; AV: visione animale; VV: visione vegetativa con il lato orale posto sulla sinistra; OV: visione dell'ectoderma orale; LV: visione laterale con il lato animale dell'embrione posto in alto.

Allo stadio di gastrula i trascritti *strim1* risultano localizzati nel territorio dell'ectoderma orale come visibile dalla Figura 11 F,G. In particolare l'espressione appare prevalentemente ristretta ad aree ectodermiche in prossimità della piastra apicale e in corrispondenza dei siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs. Ciò appare evidente in figura 11 F, che mostra una visione lungo l'asse animale vegetativo dell'embrione. L'espressione risulta altamente ristretta alle cellule cuboidali del subdominio stomodeale dell'ectoderma orale allo stadio di gastrula avanzata/prisma (Fig. 11 G,H,I). Risulta, inoltre, ridotta, in accordo con i dati relativi al profilo temporale di espressione del gene. Allo stadio di giovane pluteo, i trascritti *strim1* risultano rilevabili esclusivamente in cellule ectodermiche in prossimità dei siti di crescita delle braccia embrionali.

Pertanto, il profilo di espressione di *strim1* risulta simile a quello di altri geni, tra cui *pax2/5/8*, *otp*, *vegf* e *fgf*, noti per essere coinvolti nella regolazione della morfogenesi scheletrica del riccio di mare.



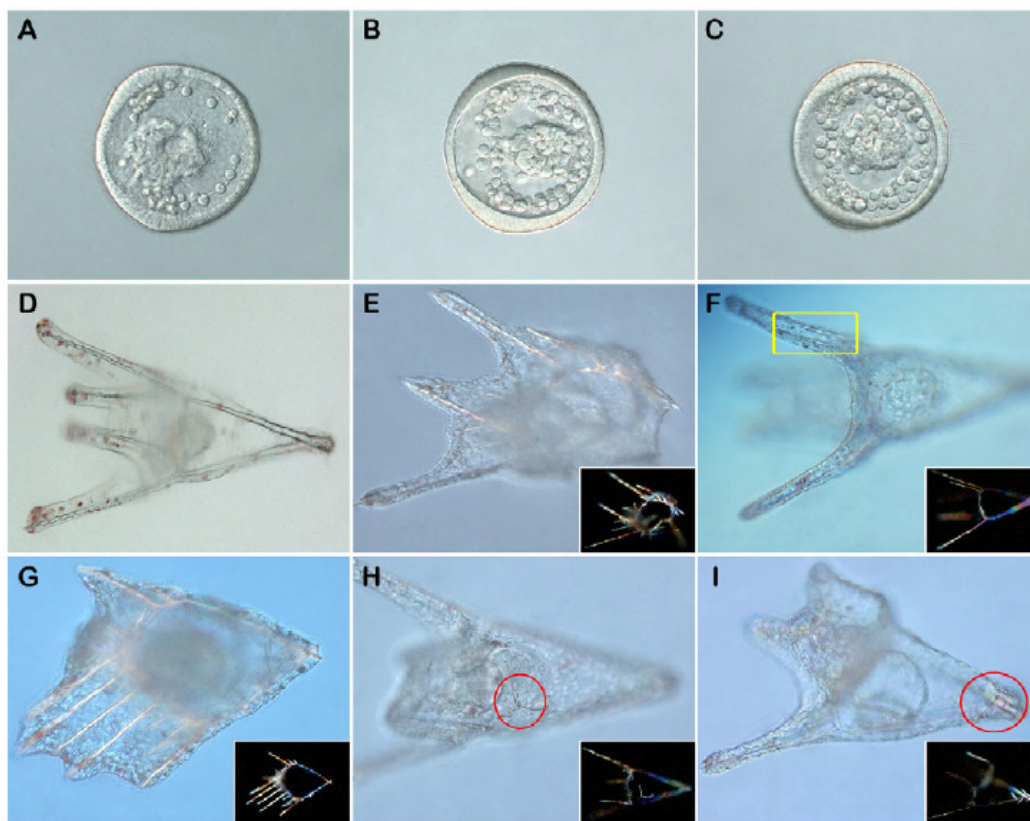
## **2.9 L'espressione ectopica di *strim1* altera la morfogenesi scheletrica**

Al fine di caratterizzare funzionalmente il gene in esame, ne è stata indotta l'espressione ectopica nell'intero embrione di *P. lividus*, tramite microiniezione in zigoti del corrispondente mRNA, ottenuto mediante trascrizione *in vitro*. Questi ultimi sono stati accuratamente osservati durante lo sviluppo, parallelamente ad embrioni controllo, al fine di individuare eventuali anomalie fenotipiche. In particolare, come controllo sono stati utilizzati embrioni non iniettati ed embrioni derivanti da zigoti iniettati con uguali quantità di glicerolo o con un mRNA *strim1* il cui modulo di lettura è stato alterato al fine di non dare luogo alla traduzione di alcun prodotto proteico significativo.

Gli embrioni iniettati subiscono uno sviluppo pressoché normale, eccetto che per anomalie ristrette alla morfogenesi scheletrica. Il fenotipo aberrante appare distinguibile a partire dallo stadio di gastrula precoce, in cui le PMCs neoformate, spesso, non mostrano la caratteristica organizzazione in clusters. È stata frequentemente riscontrata la presenza di un numero di cellule del mesenchima primario eccedente il normale valore medio di 32 caratteristico dell'embrione di *P. lividus* (Fig. 12 B,C); in alcuni casi le PMCs sovranumerarie si organizzano a costituire un terzo cluster in corrispondenza della regione apicale. In un numero limitato di embrioni a tale stadio è stata individuata la presenza di primordi scheletrici soprannumerari.

Allo stadio di pluteo (48h) l'embrione presenta i normali elementi scheletrici e la morfologia globale appare pressoché inalterata. Tuttavia un'attenta osservazione rivela la presenza di bacchette scheletriche duplicate (Fig. 12 F), prevalentemente a livello delle braccia post-orali, e di un profilo di ramificazione aberrante delle spicole. Il fenotipo derivante dall'espressione ectopica del messaggero esogeno è nettamente più evidente in embrioni a 72h di sviluppo. Ivi una o entrambe le spicole presentano estese biforcazioni in corrispondenza del *vertex* embrionale (Fig. 12 E, I) e sono osservabili elementi scheletrici sovranumerari (Fig. 12 H, I).

In casi più severi la morfologia globale dell'embrione risulta compromessa dalla presenza di numerose ramificazioni anomale, anche a livello delle bacchette ventrali trasverse (Fig. 12 G). Ciò appare chiaramente visibile osservando gli embrioni alla luce polarizzata.



**Figura 12. Difetti scheletogenici determinati dall'espressione ectopica di *trim1*.** A-C: embrioni allo stadio di gastrula in visione ventrale. D-I: embrioni allo stadio di pluteo. A,D embrioni controllo. A-I: immagini a contrasto di fase differenziale interferenziale (DIC); il riquadro in basso a destra in E-I mostra le strutture scheletriche illuminate con luce polarizzata. Il riquadro giallo in F indica una duplicazione nella bacchetta scheletrica post-orale; i cerchi rossi in H e I indicano spicole triradiate soprannumerarie.

### **2.9.1 L'espressione ectopica di *strim1* determina un aumento del numero di PMCs e altera il profilo di localizzazione dei trascritti *pax2/5/8* e *fgfA***

L'analisi dei fenotipi embrionali derivanti dall'espressione ectopica del messaggero *strim1* ha rivelato la presenza di cellule del mesenchima primario sovranumerarie in un congruo numero di embrioni iniettati (70%), allo stadio di gastrula tardiva, rispetto agli embrioni controllo. Al fine, pertanto, di confermare l'identità di tale citotipo, sono stati condotti sugli embrioni suddetti esperimenti di ibridazione *in situ* con una sonda antisenso per il marcatore PMC-specifico *msp130*. Esso codifica per una glicoproteina della superficie cellulare coinvolta nel processo di spiculogenesi (Anstrom et al., 1987). In embrioni controllo allo stadio considerato i trascritti *msp130* appaiono rilevabili in tutte le PMCs a livelli paragonabili. Come riportato in letteratura, in embrioni allo stadio di gastrula tardiva la trascrizione di *msp130* non risulta influenzata da stimoli esterni, essendo parte, probabilmente, del programma autonomo di espressione genica delle PMCs (Guss and Ettensohn, 1997). È stato riscontrato che il numero di cellule del mesenchima primario, negli embrioni iniettati, risulta essere circa il doppio rispetto agli embrioni controllo, come reso evidente dalla colorazione. La sonda *msp130* marca, infatti, una media di 65-70 PMCs nei primi (Fig. 13 B,C) rispetto alle 30-34 (Fig. 13 A) cellule marcate, normalmente presenti negli embrioni controllo di *P. lividus*. Il complemento di cellule scheletogeniche appare, dunque, numericamente alterato seppure anche le PMCs sovranumerarie tendano ad assumere la medesima organizzazione stereotipata all'interno del blastocele degli embrioni non perturbati. Esse si distribuiscono a costituire cordoni sinciziali supplementari (Fig. 13 B) o, in alcuni casi, clusters aggiuntivi (Fig. 13 C).

La scheletogenesi aberrante riscontrata in embrioni over-esprimenti *strim1* è stata correlata all'espressione ectopica del gene *pax2/5/8*. Tale gene, codificante per un fattore trascrizionale (Czerny et al., 1997), è caratterizzato, in embrioni controllo, da un'espressione zigotica che ha inizio allo stadio di blastula con mesenchima/gastrula precoce e appare ristretta a due domini ectodermici laterali in corrispondenza dei siti di localizzazione dei clusters di PMCs (Rottinger et al., 2008) (Fig. 13 D).

Pertanto, il dominio di espressione spaziale di *strim1* allo stadio di gastrula è ampiamente coincidente con quello di *pax2/5/8*. Poichè la trascrizione di *strim1* ha inizio a stadi più precoci è stato valutato se la sua over-espressione potesse influenzare quella di *pax2/5/8*.

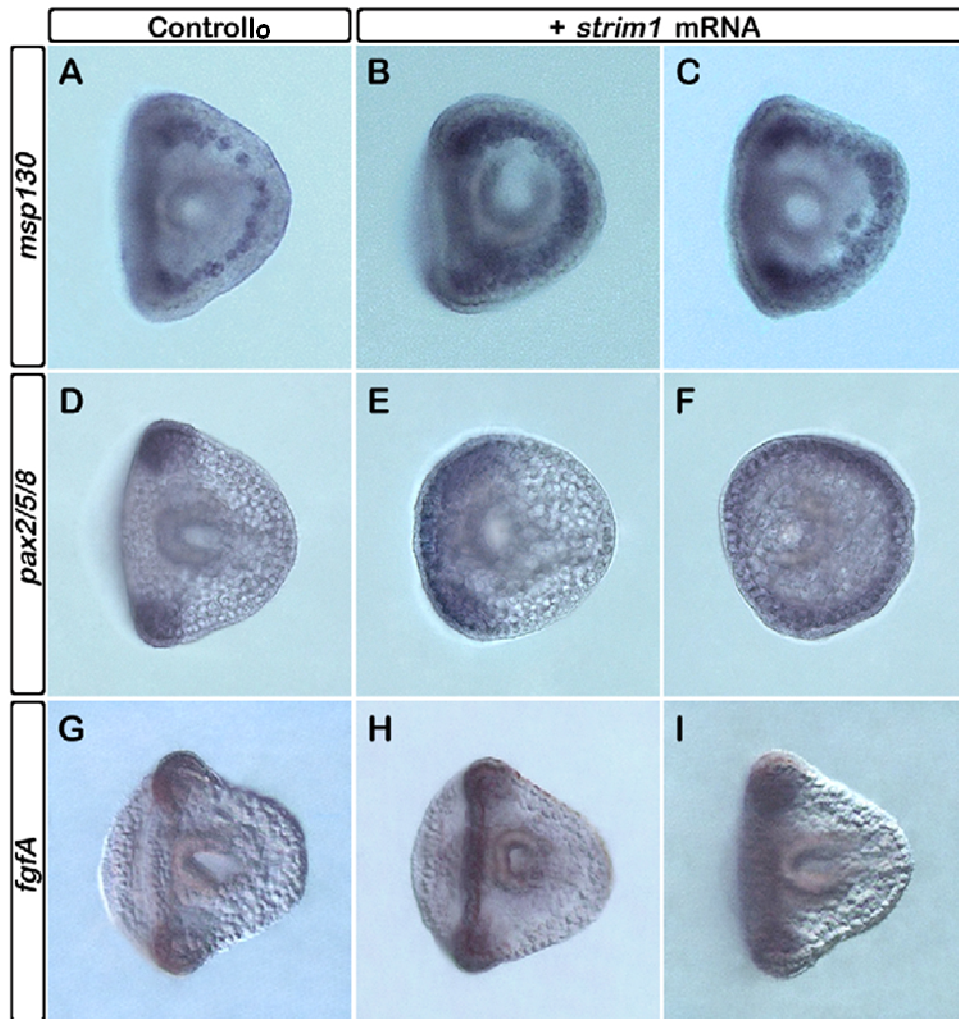
Come atteso, le anomalie scheletriche indotte dall'espressione ectopica di *strim1* sono associabili alla conseguente espansione della regione di localizzazione dei trascritti *pax2/5/8* all'intero territorio ectodermico (Fig 13 E,F).

I risultati appena descritti concordano con recenti dati in letteratura che documentano un ruolo per *pax2/5/8* nella morfogenesi scheletrica (Rottinger et al., 2008) e supportano l'ipotesi che tale gene sia un potenziale bersaglio molecolare a valle nel pathway di segnalazione di Strim1.

Come sopra menzionato, inoltre, recenti dati in letteratura, concernenti le basi molecolari della scheletogenesi, indicano il pathway di segnalazione attivato dal fattore FGFA come essenziale per una corretta morfogenesi scheletrica (Röttinger et al., 2008). Integrando tali dati con i risultati conseguiti, si osserva che il profilo di localizzazione spaziale dei trascritti *strim1* appare sovrapponibile al profilo di localizzazione ectodermica dei trascritti *fgfA*. In particolare, allo stadio di gastrula tardiva, entrambi i geni risultano espressi in domini ectodermici ventro-laterali, in corrispondenza del sito di localizzazione dei clusters di PMCs. Tuttavia, l'inizio della trascrizione di *strim1* precede quello di *fgfA*.

È, inoltre, documentato che Pax2/5/8 opera nell'ambito della cascata di segnalazione attivata dal fattore FGFA (Rottinger et al., 2008). Analogamente, i risultati conseguiti supportano l'ipotesi che il gene sia anche un potenziale bersaglio molecolare nel pathway di segnalazione di Strim1. Al fine, pertanto, di ottenere maggiori delucidazioni circa i geni che costituiscono il network di segnalazione epitelio-mesenchimale e le loro relazioni gerarchiche, è stato valutato l'effetto dell'espressione ectopica di *strim1* sul profilo di localizzazione dei trascritti *fgfA*, mediante WMISH. Come mostrato in figura 14, in embrioni allo stadio di gastrula avanzata esprimanti *strim1* ectopicamente si osserva una espansione della regione di localizzazione dei trascritti *fgfA* all'intero territorio dell'ectoderma ventrale, rispetto ad embrioni non perturbati. L'espansione spaziale non appare estesa ad ulteriori sub-domini ectodermici o all'endomesoderma.

I livelli di espressione di *pax2/5/8* e *fgfA*, in embrioni allo stadio di gastrula overesprimanti *strim1*, sono stati, inoltre, valutati mediante analisi QPCR, confermando i risultati ottenuti mediante WMISH.

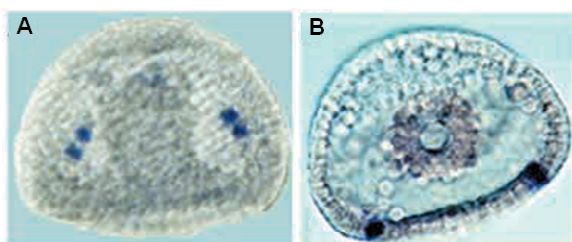


**Figura 13.** Effetto dell'espressione ectopica di *strim1* sulla trascrizione dei geni *msp130* , *pax2/5/8* e *fgfA*. A-C: localizzazione dei trascritti *msp130* in embrioni allo stadio di gastrula. D-F: localizzazione dei trascritti *pax2/5/8* in embrioni allo stadio di gastrula. G-I: localizzazione dei trascritti *fgfA* in embrioni allo stadio di gastrula. A, D e G: embrioni controllo.

### **2.9.2 L'espressione ectopica di *strim1* non influenza i livelli di trascritti *veg* ma determina un notevole aumento del livello di espressione di *otp***

Come recentemente riportato in letteratura, i pathways di segnalazione dipendenti dai fattori VEGF e FGFA sembrano essere indipendenti e funzionalmente non ridondanti, seppure entrambi essenziali per una corretta morfogenesi scheletrica (Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008). Pertanto, al fine di delucidare la posizione di *strim1* in un determinato subcircuito del network di geni regolatori del differenziamento scheletogenico, è stato valutato l'effetto della sua over-espressione anche sui livelli di trascritti *veg*, caratterizzati, allo stadio di gastrula, da un profilo di localizzazione sovrapponibile a quello del mRNA codificante per *Strim1*. È stato riscontrato che la distribuzione spaziale dei trascritti *veg*, analizzata mediante WMISH, risulta non influenzata dall'espressione ectopica di *strim1* e, pertanto, analoga tra embrioni controllo ed embrioni sottoposti a perturbazione dell'espressione genica. Tale dato è stato confermato dall'analisi quantitativa mediante QPCR condotta a partire da RNA estratto da embrioni allo stadio di gastrula, overesprimenti *strim1*.

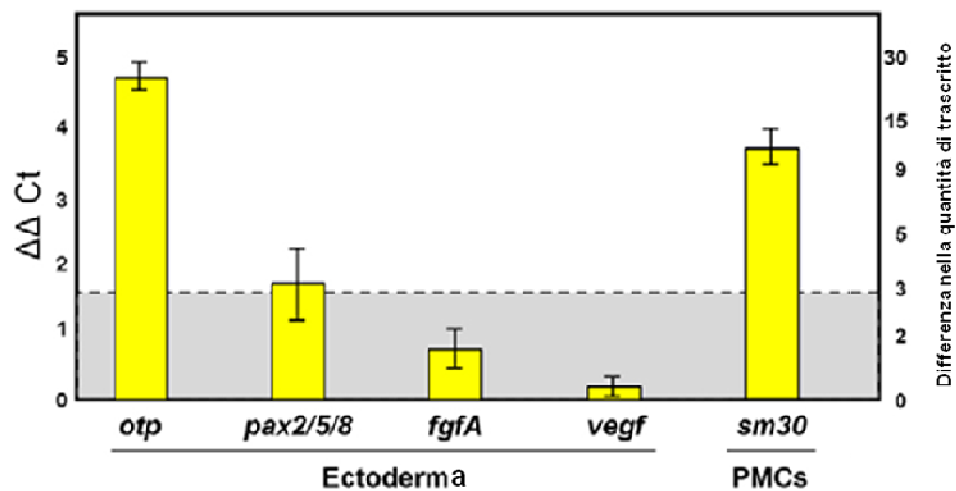
Il medesimo approccio quantitativo è stato, inoltre adottato per saggiare l'effetto dell'espressione ectopica di *strim1* sui livelli di trascritto corrispondente al gene *otp*, codificante per un fattore trascrizionale con omeodominio. Studi pregressi sottolineano il ruolo chiave svolto da tale gene nella regolazione della morfogenesi scheletrica, e in particolare, nell'interazione epitelio-mesenchima (Cavalieri et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999). Il profilo di localizzazione dei trascritti *otp* allo stadio di mid-gastrula è altamente ristretto a due coppie di cellule dell'ectoderma orale, distribuite in maniera simmetrica rispetto all'asse destra/sinistra e corrispondenti ai siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs (Fig. 14). L'analisi quantitativa, è apparsa pertanto, particolarmente idonea, rispetto alla tecnica WMISH, ai fini della suddetta valutazione.



**Figura 14. Profilo di localizzazione dei trascritti *otp* in embrioni di *P. lividus* allo stadio di gastrula (Di Bernardo et al., 1999). (A) Vista ventrale; (B) Vista lungo l'asse Animale-Vegetativo.**

Con notevole interesse, è stato riscontrato un considerevole aumento dei livelli di espressione di *otp*, massimale rispetto agli altri geni saggiati, in seguito ad espressione ectopica di *strim1*. Analogo effetto è stato riscontrato per quanto concerne i livelli di trascritto *sm30*, marcatore delle PMCs funzionalmente correlato ad *otp* (Cavalieri et al., 2003) (Fig. 15). Dati in letteratura indicano che l'espressione mesenchimale di *sm30* risulta influenzata da segnali di origine ectodermica (Guss and Ettensohn, 1997). In tale contesto, l'inibizione funzionale di *otp* riduce notevolmente i livelli di espressione di *sm30* (Cavalieri et al., 2003).

Nel complesso, i risultati sopra descritti, collimano con quanto recentemente riportato da Duloquin et al., circa la mancata probabilità che *otp* regoli *veg*f, in quanto la sua espressione risulta attivata più tardivamente rispetto a *veg*f ed in un territorio più ristretto (Duloquin et al., 2007). Inoltre, l'espressione di *otp* non risulta influenzata dalla perdita di funzione di *fgfA* (Röttinger et al., 2008). Viceversa, è probabile che *otp* e *strim1* siano parte del medesimo subcircuito del network scheletogenico.

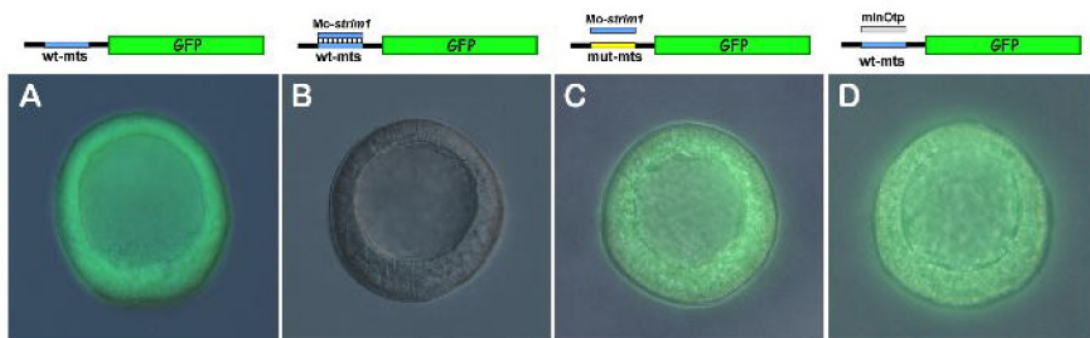


**Figura 15. Cambiamento dei livelli di espressione di geni marcatori saggiati mediante Q-PCR in embrioni esprimanti *strim1* ectopicamente, allo stadio di gastrula avanzata.** I dati sono indicati come  $\Delta C_t$  ( $\Delta\Delta C_t$  sull'asse delle ordinate sinistro) e come differenza corrispondente nei livelli di trascritto (asse delle ordinate destro), rispetto ad embrioni controllo iniettati allo stesso stadio di sviluppo. Le regioni in grigio corrispondono ai valori di  $\Delta\Delta C_t$  corrispondenti a variazioni non significative.



## 2.10 La perdita di funzione di *strim1* altera il posizionamento delle PMCs e blocca la scheletogenesi

Al fine di confermare i dati funzionali ottenuti, è stato valutato l'effetto derivante dalla perdita di funzione di *strim1*, ottenuta mediante l'impiego di un oligonucleotide morfolino antisenso (Eisen and Smith, 2008). Questa è stata ottenuta mediante la microiniezione in zigoti di un oligonucleotide morfolino antisenso (*Mo-strim1*), di 25 nucleotidi, complementare al sito di inizio della traduzione sulla sequenza dell'mRNA di *strim1*. La specificità di tale oligonucleotide per il bersaglio molecolare di interesse e la sua funzionalità *in vivo* è stata preliminarmente saggiata utilizzando una costruzione in cui la regione 5' non tradotta del messaggero di *strim1*, comprendente il codone di inizio della traduzione ATG e la sequenza bersaglio di *Mo-strim1*, è stata fusa alla sequenza codificante per la GFP (la costruzione risultante è indicata come pCS2-5'*strim1*-GFP). Utilizzando come stampo la suddetta costruzione, opportunamente linearizzata, è stato sintetizzato *in vitro* un trascritto successivamente microiniettato in zigoti, singolarmente o in combinazione con un eccesso di *Mo-strim1*. Il controllo negativo di tale esperimento è rappresentato dalla microiniezione, concomitantemente alla costruzione pCS2-5'*strim1*-GFP, dell'oligonucleotide morfolino di controllo mInOtp, che non ha alcun effetto sullo sviluppo embrionale (Cavalieri et al., 2003). Gli embrioni sono stati osservati allo stadio di blastula con un microscopio a fluorescenza. Come illustrato in figura 15, gli embrioni iniettati con l'RNA codificante per il prodotto 5'*strim1*-GFP mostrano una fluorescenza diffusa, indice della distribuzione uniforme del trascritto sintetico nel citoplasma dello zigote e della sua efficiente traduzione nell'embrione (Fig. 16 A).



**Figura 16. Acquisizioni relative agli esperimenti di verifica della specificità e della funzionalità *in vivo* di *Mo-strim1*.** (A-D) Inibizione della traduzione della proteina GFP mediata da *Mo-strim1*. Zigoti sono stati co-iniettati con un mRNA sintetico codificante per la GFP (schematizzazioni superiori) contenente, nella regione 5'UTR, una sequenza target complementare a *Mo-strim1* (mts) (segmento blu in A, B, D), o una sequenza mts mutata (segmento giallo in C).



Di contro, la perdita di espressione della GFP in tutti gli embrioni co-iniettati, dimostra l'effettivo riconoscimento della sequenza bersaglio da parte di *Mo-strim1* e l'inibizione specifica della produzione della proteina GFP *in vivo* (Fig. 16 B).

Come ulteriore controllo, numerosi embrioni sono stati co-iniettati con *Mo-strim1* e una forma alterata dell'RNA codificante per *5'strim1*-GFP, in cui è stata indotta la mutazione di 8 nucleotidi nella sequenza bersaglio di *Mo-strim1*, al fine di rendere tale sequenza non riconoscibile dall'oligonucleotide morfolino antisense in esame.

Un intenso segnale di fluorescenza è stato rilevato in un elevato numero di tali embrioni (Fig. 16 C) Come atteso la co-iniezione di mInOtp e il suddetto RNA, nelle forme mutata e non (Fig. 16 D), non riduce visibilmente la fluorescenza derivante dalla GFP.

Appurata, dunque, la specificità di *Mo-strim1*, questo è stato iniettato in cellule uovo fecondate, derivanti da diversi lotti, in concentrazioni comprese tra 0.8 e 2.0 mM, previa verifica della mancata efficacia di *Mo-strim1* a concentrazioni inferiori e testata la sua tossicità aspecifica per gli embrioni a concentrazioni superiori a 2.0 mM.

Gli embrioni sono stati ripetutamente osservati durante lo sviluppo, parallelamente ad embrioni controllo, al fine di individuare eventuali anomalie fenotipiche. In particolare, come controllo sono stati utilizzati embrioni non iniettati ed embrioni derivanti da zigoti iniettati con morfolino controllo mInOtp alle medesime concentrazioni, i quali non presentano, come atteso, alcuna aberrazione (Fig. 17 A-C).

È stato riscontrato che l'iniezione di *Mo-strim1* determina aberrazioni fenotipiche prevalentemente ristrette alle strutture scheletriche e di varia entità dose-dipendente.

Un fenotipo più severo ed altamente penetrante è stato osservato nel 90 % degli embrioni iniettati con *Mo-strim1* in concentrazioni comprese tra 1.5-2.0 mM (Fig. 17 D-M).

Le aberrazioni morfologiche appaiono particolarmente evidenti a partire dallo stadio di gastrula precoce; si riscontra un complemento apparentemente normale di PMCs, che, come rilevato attraverso accurate osservazioni microscopiche anche a stadi di sviluppo più precoci, effettuano l'ingresso in tempi analoghi ad embrioni non perturbati (Fig. 17 D). Tuttavia, non si verifica il processo di migrazione direzionale osservato negli embrioni controllo e tali cellule rimangono a costituire una popolazione disorganizzata in prossimità del polo vegetativo o appaiono intersperse nel blastocle. Esse mantengono una forma pressoché sferica e risulta assente l'emissione dei filopodi necessari per il processo di migrazione.



**Figura 17. Alterazione del posizionamento delle PMCs e blocco della scheletogenesi in seguito al blocco della traduzione di *strim1*.** (A-M) Immagini DIC di embrioni controllo (A-C) e morfanti (D-M) osservati dopo 16 h (A,D), 24 (B,E) e 60 h (C, F-M) di sviluppo. La concentrazione delle soluzioni iniettate è pari a 1.8mM. La freccia gialla in I indica la presenza di un'unica spicola triradiata.

Si riscontra la mancata formazione di uno o di entrambi i clusters ventro-laterali di PMCs e dei primordi delle spicole triradiate (Fig. 17 D-H).

Pertanto embrioni caratterizzati da tale fenotipo risultano privi di scheletro e presentano, allo stadio di pluteo, una forma meno definita. Le polarità animale-vegetativa e orale-aborale appaiono mantenute, ma lo scheletro è del tutto assente.

Inoltre, negli embrioni iniettati con Mo-*strim1* l'intestino tripartito segue un corretto sviluppo, ma fallisce la connessione all'ectoderma orale e non si verifica l'apertura dello stomodeo, probabilmente perché il differenziamento terminale dell'ectoderma in tale dominio risulta compromesso. Parte degli embrioni osservati presenta fenotipi intermedi quali la formazione di una sola spicola triradiata (Fig. 17 I) o di due elementi scheletrici inadeguati, posizionati correttamente, ma dimensionalmente sproporzionati l'uno rispetto all'altro (Fig. 17 L). Plausibilmente, ciò è interpretabile come riflesso di una interferenza soltanto parziale sulla traduzione di *strim1* endogeno in tali embrioni.

Infine, a dosi inferiori a 1.2 mM si osserva, più frequentemente, un fenotipo più lieve, seppure altamente riproducibile, caratterizzato dalla crescita parallela delle bacchette scheletriche nella regione aborale (Fig.17 M).

In un numero limitato di casi, l'embrione allo stadio di pluteo appare, inoltre, caratterizzato da uno sviluppo inferiore alla norma delle braccia orali. Un'esigua percentuale di embrioni risulta, invece, fenotipicamente normale.

I fenotipi descritti sono stati osservati in molti dei saggi sperimentali attuati, in percentuale differente a seconda del lotto di cellule uovo utilizzate e della concentrazione di Mo-*strim1* iniettata. In alcuni casi è stato riscontrato un leggero ritardo nel processo di gastrulazione, non ascrivibile all'azione dell'oligonucleotide morfolino antisense, bensì di carattere aspecifico e transiente.

### **2.10.1 La perdita di funzione di *strim1* altera l'espressione dei geni *pax2/5/8*, *fgfA*, *otp* ma non influenza i livelli di trascritto *vegf***

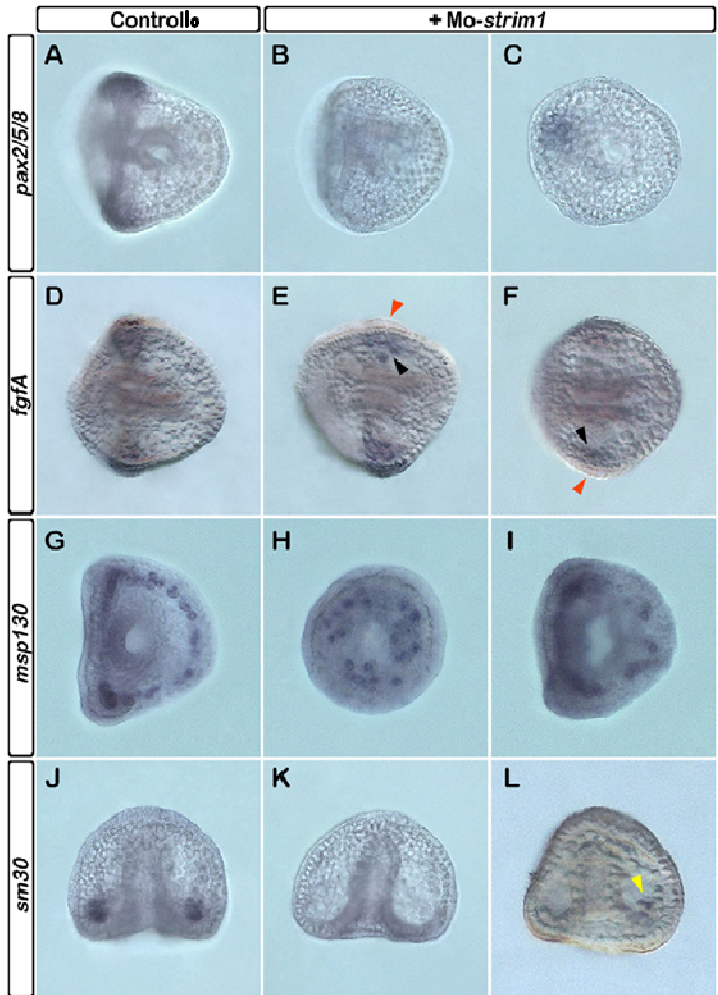
Al fine di individuare bersagli molecolari di *strim1* nel medesimo territorio ectodermico di espressione, analogamente a quanto effettuato per studiare gli effetti molecolari dell'espressione ectopica di *strim1*, sono stati condotti esperimenti di ibridazioni *in situ* su embrioni interi in cui la funzione di Strim1 è stata bloccata mediante l'oligonucleotide morfolino antisense specifico Mo-*strim1*. È stata saggiata, in primo luogo l'espressione del gene codificante per il fattore di trascrizione Pax2/5/8, il cui profilo di localizzazione dei trascritti in embrioni controllo, allo stadio di gastrula, è sovrapponibile a quello di *strim1* (Fig. 18 A), sebbene quest'ultimo sia espresso a partire da stadi più precoci. Come atteso, la perdita di funzione di *strim1* determina il quasi totale annullamento dell'espressione di *pax2/5/8* nel 70% degli embrioni iniettati con Mo-*strim1* allo stadio di gastrula avanzata (Fig. 18 B). Nei rimanenti embrioni i trascritti *pax2/5/8* sono scarsamente rilevabili, ma mostrano una localizzazione unilaterale anomala nell'ectoderma (Fig. 18 C), rispetto ad embrioni controllo. I risultati ottenuti, confermando i dati derivanti da WMISH su embrioni esprimenti *strim1* ectopicamente, identificano *pax2/5/8* come bersaglio molecolare a valle di *strim1* in cellule ectodermiche.

Per quanto concerne la localizzazione dei trascritti *fgfA*, la perdita di funzione di *strim1* sembra avere su di essa un effetto di entità inferiore rispetto all'effetto sul gene appena descritto e limitato al profilo di localizzazione dei trascritti in territorio ectodermico.

In embrioni controllo allo stadio di gastrula (Fig. 18 D) l'espressione di *fgfA* è rilevabile nelle regioni dell'ectoderma ventrolaterale, oltre che in PMCs posizionate al centro dei clusters neoformati (Röttinger et al., 2008). In embrioni in cui la funzione di *strim1* è bloccata si riscontra una riduzione nel numero di cellule ectodermiche esprimenti *fgfA*, spesso unilaterale (Fig. 18 E,F). Tale fenotipo, comunque, appare rilevabile soltanto nel 20% degli embrioni iniettati. A livello dei clusters di PMCs di embrioni perturbati si continua a rilevare la presenza dei trascritti specifici. I risultati sopra descritti sono stati confermati mediante analisi quantitativa QPCR. A differenza di *pax2/5/8* e *fgfA*, e in accordo con i dati molecolari relativi all'espressione ectopica di *strim1*, i livelli di trascrizione di *vegf* risultano non influenzati dalla perdita di funzione di *strim1*.

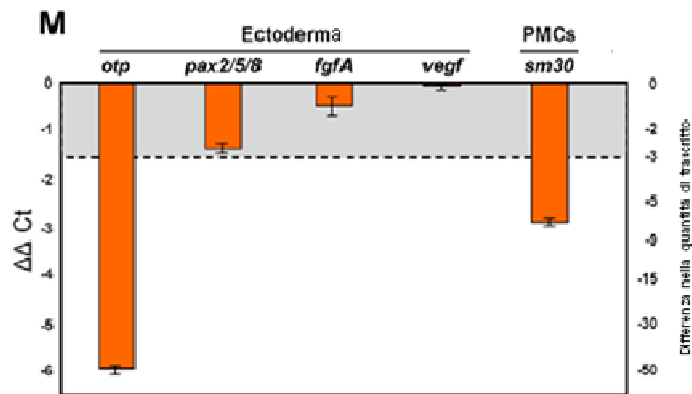
Per quanto concerne *otp*, l'analisi quantitativa rileva il totale annullamento dell'espressione genica relativa in embrioni iniettati con l'oligonucleotide morfolino

specifico per *strim1*, supportando ulteriormente l'ipotesi di un legame funzionale tra quest'ultimo e *otp*.



**Figura 18. Effetto della perdita di funzione di *strim1* sulla trascrizione dei geni *pax2/5/8*, *fgfA* e *sm30*.** A-L: Embrioni iniettati con *Mo-strim1* fissati allo stadio di gastrula e analizzati per WISH con le sonde antisense indicate. A,D,G,J: embrioni controllo. A-I: vista vegetativa. J-L: vista laterale. Le frecce rossa e nera in E, F indicano, rispettivamente, la regione ectodermica in cui si riduce l'espressione di *fgfA* e le PMCs in cui essa permane. La freccia gialla in L indica la marcatura specifica per *sm30* in poche PMCs.

In M: Cambiamento dei livelli di espressione di geni marcatori saggiata mediante Q-PCR in embrioni morfanti, allo stadio di gastrula avanzata. I dati sono indicati come  $\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct$  sull'asse delle ordinate sinistro) e come differenza corrispondente nel livello di trascritto (asse delle ordinate destro), rispetto ad embrioni controllo iniettati allo stesso stadio di sviluppo. Le regioni in grigio corrispondono ai valori di  $\Delta\Delta Ct$  corrispondenti a variazioni non significative.



### **2.10.2 La perdita di funzione di *strim1* non altera il numero di PMCs ma abolisce l'espressione del gene *sm30***

Ipotizzando un ruolo di *strim1* nell'ambito di una segnalazione diretta dall'ectoderma alle cellule del mesenchima primario, è stato saggiato il comportamento delle PMCs in embrioni in cui la funzione di *strim1* è bloccata, mediante l'analisi dell'espressione di due marcatori PMCs specifici, *msh130* e *sm30*, utilizzando sonde antisense specifiche.

In embrioni controllo allo stadio di gastrula avanzata i trascritti *msh130* sono rilevabili a livelli paragonabili in tutte le PMCs (Fig. 18 G). In accordo con dati in letteratura (Anstrom et al., 1987; Carson et al., 1985; Guss and Ettensohn, 1997) secondo cui in embrioni allo stadio di gastrula avanzata la trascrizione di *msh130* non risulta influenzata da segnali esterni, è stato riscontrato che l'espressione di tale gene non risulta significativamente alterata dal blocco della funzione di *strim1* (Fig. 18 H, I).

Gli esperimenti suddetti hanno, pertanto, consentito di verificare che nei morfanti il complemento di PMCs sia numericamente analogo a quello di embrioni non perturbati al medesimo stadio, sebbene nel 70% degli embrioni la distribuzione delle cellule del mesenchima primario nel blastocele sia disorganizzata (Fig. 18 I).

Appurato ciò, è stato valutato l'effetto del blocco della funzione di *strim1* sull'espressione del gene *sm30*. Numerose linee di evidenza dimostrano che l'espressione del gene *sm30* è associata alla deposizione di elementi scheletrici e che è strettamente dipendente da segnali derivanti dall'ectoderma (Cavaliere et al., 2003; Duloquin et al., 2007; Röttinger et al., 2008). In embrioni normali allo stadio di gastrula *sm30* è espresso da tutte le PMCs, in particolare a livello dei clusters ventro-laterali (Fig. 18 J). Con particolare interesse è stato riscontrato che in morfanti *strim1* privi di spicole biomineralizzate l'espressione di *sm30* è totalmente annullata (Fig. 18 K), come rilevabile mediante WMISH e analisi QPCR. In rari casi i trascritti *sm30* sono debolmente rilevabili in un esiguo numero di PMCs (Fig. 18 L).

I risultati appena descritti, pertanto, indicano fortemente che *strim1* sia necessario per il corretto posizionamento delle PMCs nel blastocele. Inoltre, probabilmente *strim1* non è richiesto per la specificazione di tali cellule ma appare essenziale per l'attivazione dell'espressione di geni del differenziamento terminale, quali *sm30*, associati all'avvio della morfogenesi scheletrica.

## **2.11 Una sorgente localizzata di *strim1* ripristina la biomineralizzazione scheletrica in embrioni morfanti**

Un esperimento cruciale per supportare ulteriormente le ipotesi formulate nel corso dello studio è stato un saggio di recupero di funzione, volto a valutare se una sorgente esogena di *strim1*, in embrioni in cui la funzione del gene endogeno era stata bloccata, fosse in grado di ripristinare la morfogenesi scheletrica, inducendo la spiculogenesi. Al fine di impedire l'inibizione della traduzione del trascritto esogeno codificante per Strim1, da parte dell'oligonucleotide morfolino antisenso specifico, è stato sintetizzato un mRNA, denominato m8-strim1, recante 8 nucleotidi mutati nella sequenza riconosciuta da *Mo-strim1*.

L'esperimento è stato condotto iniettando *Mo-strim1* in zigoti, concomitantemente al tracciante Texas Red coniugato a destrano (TRCD) al fine di discriminare di individuare univocamente gli embrioni iniettati, che emettono fluorescenza rossa. Successivamente, allo stadio di 8 cellule l'mRNA *m8-strim1* è stato iniettato in un blastomero, selezionato in maniera casuale, dei soli embrioni fluorescenti, unitamente al messaggero codificante per la GFP (Fig. 19 A). Ciò al fine di seguire il destino delle cellule sottoposte alla seconda microiniezione. Lo sviluppo di tali embrioni è stato seguito fino al raggiungimento dello stadio di pluteo da parte dei controlli non iniettati.

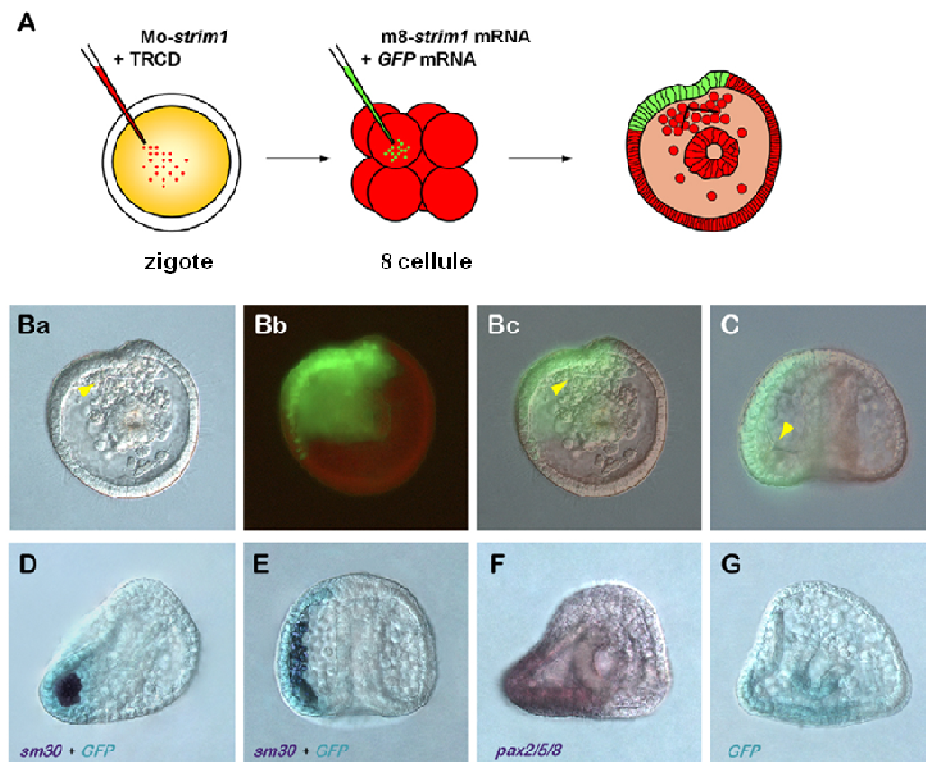
Poichè *strim1* è normalmente espresso da blastomeri dell'emisfero animale, gli embrioni in via di sviluppo fluorescenza nell'ectoderma, sono stati selezionati per le osservazioni al microscopio. Come atteso, embrioni iniettati con il solo trascritto codificante per la GFP, osservati allo stadio di prisma, subiscono uno sviluppo normale. Di contro, una frazione significativa di embrioni sottoposti alla doppia iniezione, corrispondente a circa il 53%, mostra una morfologia radializzata (Fig. 19 B). In ciascuno di tali embrioni le PMCs effettuano l'ingressione nel blastocele e assumono un assetto organizzato generando un aggregato a livello del quale si forma una spicola triradiata.

L'osservazione degli embrioni in microscopia a contrasto differenziale interferenziale e in fluorescenza rivela chiaramente che la localizzazione del cluster di PMCs e della spicola è in stretta corrispondenza con il profilo di marcatura dato dalla GFP, coincidente con la regione ectodermica esprimente *strim1* (Fig. 19 B, C).

Tale risultato, di rilevante importanza, conferma che il clone di cellule esprimente *strim1* è in grado di attrarre le PMCs e influenzarne il comportamento, inducendo l'elaborazione di elementi scheletrici. Per approfondire ulteriormente il ruolo di *strim1*



nella regolazione della scheletogenesi, è stata saggiata, mediante WMISH, l'espressione dei geni *pax2/5/8* e *sm30* in embrioni sottoposti ad esperimenti di recupero della funzione, e, pertanto caratterizzati da espressione clonale di *strim1*. In ciascun esperimento l'ibridazione con le sonde antisenso per *sm30* e *pax2/5/8* è stata condotta concomitantemente all'ibridazione con una sonda marcata con fluoresceina, diretta contro il trascritto codificante per la GFP, al fine di identificare univocamente le cellule esprimenti *strim1* esogeno. Come atteso, *sm30* risulta espresso esattamente negli aggregati di PMCs adiacenti all'ectoderma esprimente *GFP/strim1* (Fig. 19 D, E). Gli embrioni sottoposti a saggi di recupero della funzione, inoltre, mostrano una corrispondenza quasi perfetta nel dominio di espressione spaziale di *GFP/strim1* e *pax2/5/8* (Fig. 19 F, G). La complementazione dei risultati ottenuti conferma fortemente l'ipotesi di un ruolo di *strim1* nel dirigere la scheletogenesi influenzando l'espressione dei geni *sm30* e *pax2/5/8*.



**Figura 19. Recupero della biomineralizzazione delle spicole mediante l'espressione clonale di *strim1* in morfanti *strim1*.** A. Rappresentazione schematica dell'esperimento. Ba-C Esempi rappresentativi di embrioni sottoposti a recupero di funzione osservati mediante DIC e fluorescenza. Le frecce gialle indicano una spicola triradiata. D-G Embrioni analizzati mediante doppia ibridazione *in situ* con le sonde antisenso indicate.

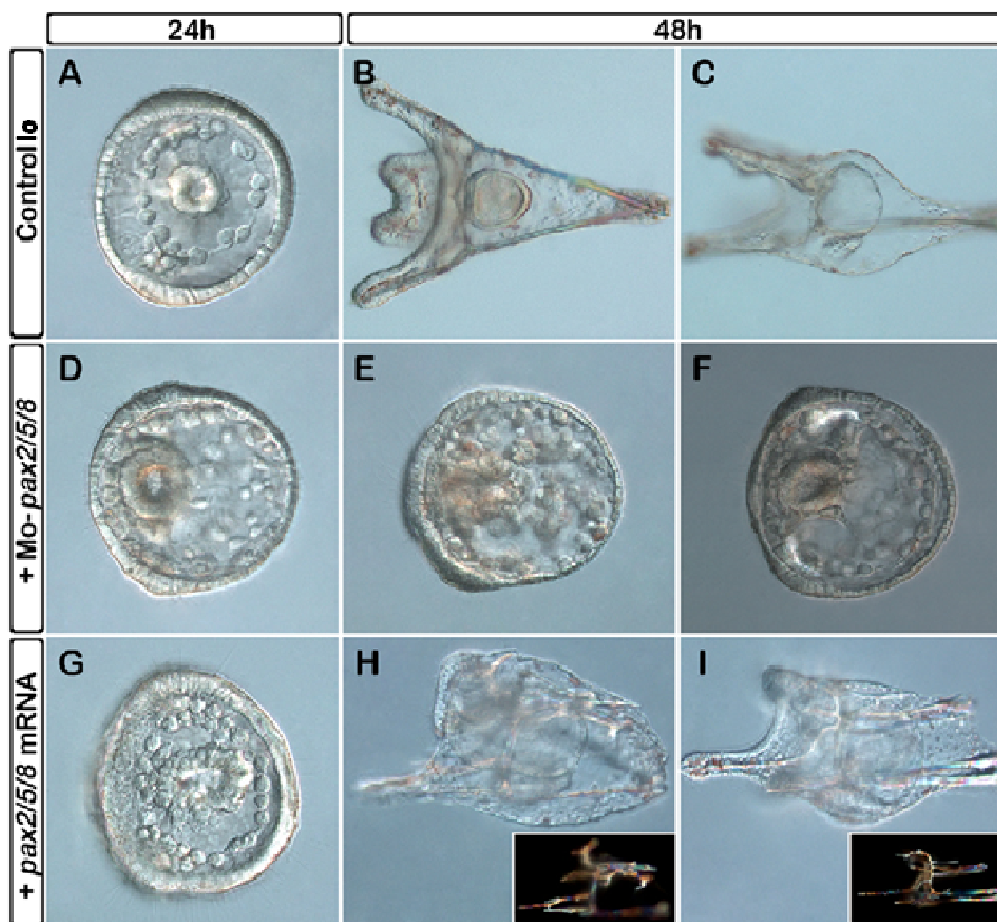


### ***2.12 La perdita di funzione e l'espressione ectopica di $pax2/5/8$ determinano alterazioni della morfogenesi scheletrica***

Sulla base dei dati in letteratura circa il ruolo di  $pax2/5/8$  nella regolazione della morfogenesi scheletrica (Röttinger et al., 2008) e alla luce dei risultati sin qui descritti circa la relazione funzionale tra *strim1* e il gene suddetto, una serie di esperimenti sono stati condotti al fine di approfondire la funzione di  $pax2/5/8$  nell'ambito della morfogenesi. Ne è stata, pertanto, indotta la perdita di funzione, iniettando in zigoti un oligonucleotide morfolino antisenso (*Mo-pax2/5/8*) diretto contro il codone di inizio della traduzione sul mRNA corrispondente. È stato riscontrato con interesse che circa il 70% degli embrioni iniettati mostrano il medesimo fenotipo ottenuto iniettando alte dosi di *Mo-strim1* (Fig. 20 D,E). Si riscontra, infatti, una corretta ingressione nel blastocele delle PMCs, anche a livello temporale, ma esse non assumono un'organizzazione stereotipata, bensì si disperdono nella cavità embrionale e non originano spicole. Inaspettatamente, dopo 48 ore di sviluppo, le PMCs degli embrioni morfanti presentano un parziale recupero dell'attività di biomineralizzazione. Infatti, due rudimenti triradiati si formano nelle posizioni corrette (Fig. 20 F), ma non subiscono il medesimo allungamento di embrioni controllo allo stesso stadio. Come in molti esperimenti precedenti, il controllo è ivi rappresentato da embrioni controllo non sottoposti a microiniezione o iniettati con solo glicerolo.

Al fine di delucidare al meglio le implicazioni dei risultati ottenuti, è stata, inoltre, indotta l'espressione ectopica del messaggero codificante per  $Pax2/5/8$ , iniettato in zigoti. Gli embrioni risultanti si sviluppano quasi normalmente fino allo stadio di gastrula e presentano un corredo normale di PMCs (Fig. 20 G). A stadi tardivi, comunque, l'espressione uniforme di  $pax2/5/8$  esogeno, aggiuntiva a quella del gene endogeno, induce alterazioni visibili del profilo scheletogenico. Più del 95% degli embrioni overesprimenti  $pax2/5/8$  mostra, infatti, un profilo di ramificazione delle spicole aberrante (Fig. 20 H,I), indicando che  $pax2/5/8$  interferisce con tale processo.

A supporto di ciò, la co-iniezione in zigoti *Mo-pax2/5/8* e di un mRNA codificante per  $pax2/5/8$ , mutato nella sequenza bersaglio per l'oligonucleotide morfolino, induce un recupero completo della formazione delle spicole, ma determina un profilo di ramificazione irregolare.



**Figura 20. Correlazione funzionale tra *strim1* e *pax2/5/8*.** A-I Embrioni controllo (A-C), iniettati con *Mo-pax2/5/8* (D-F) e mRNA codificante per *pax2/5/8* (J-L) allo stadio di gastrula (A, D, G) e pluteo (K, L). J-L Esempi rappresentativi di embrioni di embrioni rescued mediante la co-iniezione di *Mo-strim1* e mRNA *pax2/5/8*. A-L immagini DIC. L'angolo in basso a destra in H e I, mostra immagini in campo scuro dello scheletro.

### **2.13 L'espressione ectopica di *otp* o *pax2/5/8* induce il recupero del programma scheletrico in embrioni in cui la funzione di *strim1* è stata bloccata**

Alla luce di dati in letteratura circa il ruolo del prodotto del gene *otp* nel controllo della morfogenesi scheletrica embrionale (Cavalieri et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999) e considerando i risultati sopra descritti circa la caratterizzazione funzionale di *pax2/5/8* in *P. lividus* è stata ipotizzata la possibilità di indurre il recupero di anomalie scheletriche causate dalla perdita di funzione di *strim1*, anche supplementando l'embrione di una sorgente esogena di *otp* o *pax2/5/8*.

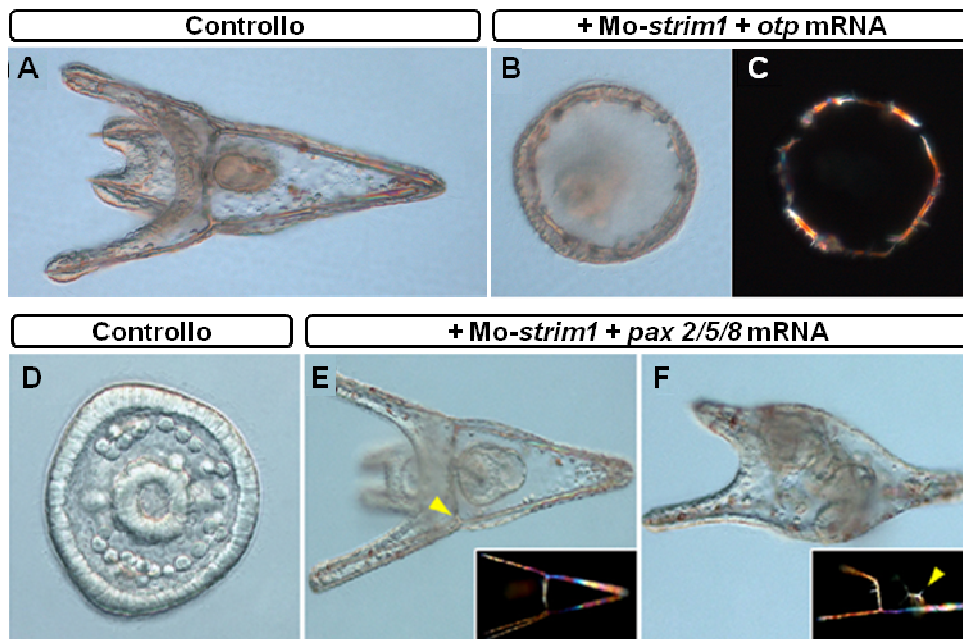
In primo luogo, valutati i dati quantitativi circa l'aumento considerevole dei livelli di trascrizione del gene *otp* in seguito ad espressione ectopica di *strim1*, e i risultati reciproci in embrioni iniettati con Mo-*strim1*, è stato effettuato un ulteriore esperimento per delucidare la relazione funzionale tra i due geni.

Studi pregressi hanno verificato il ruolo di *otp* nel controllo della morfogenesi scheletrica (Cavalieri et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999). La sua overespressione induce, infatti, un profilo scheletrico radializzato (Di Bernardo et al., 1999), mentre l'inibizione funzionale, condotta mediante un oligonucleotide morfolino antisense o ingegnerizzando una forma dominante negativa di *otp*, annulla la scheletogenesi. Questa risulta ripristinata dall'eventuale iniezione del messaggero codificante per *otp* in embrioni morfantici (Cavalieri et al., 2003).

A corredo di ciò è stato riscontrato che il totale recupero della sintesi scheletrica è ottenibile in seguito alla co-iniezione del mRNA funzionale codificante per *otp* e Mo-*strim1*, sebbene l'espressione ectopica di *otp* determini una distribuzione radiale di spicole soprannumerarie intorno all'archenteron. (Fig. 21 B,C). Ciò risulta particolarmente evidente osservando gli embrioni con luce polarizzata.

Per quanto concerne *pax2/5/8*, come atteso, la co-iniezione in zigoti del corrispondente mRNA funzionale e di Mo-*strim1* ripristina una morfologia pressoché normale nell'80% degli embrioni osservati allo stadio di pluteo (Fig. 21 E,F). Ad ogni modo, nella maggior parte degli embrioni sottoposti a recupero della funzione, l'espressione ectopica di *pax2/5/8* consente il recupero della capacità di formare lo scheletro, ma il profilo di ramificazione delle spicole risulta irregolare (Fig. 21 E, F).

Questi dati indicano che Strim1, parallelamente alla regolazione di ulteriori bersagli, è in grado di attivare l'espressione di *otp* e *pax2/5/8* in cellule ectodermiche al fine di guidare il posizionamento delle PMCs e la biomineralizzazione scheletrica durante l'embriogenesi.



**Figura 21. Recupero del programma scheletogenico mediato da *otp* e *pax 2/5/8* in embrioni in cui la funzione di *strim1* è stata bloccata . (A-C) *otp*; (D-F) *pax2/5/8*. A,D: Embrioni controllo; B,C: Embrioni iniettati con Mo-*strim1* e mRNA codificante per Otp; E,F Embrioni iniettati con Mo-*strim1* e mRNA codificante per Pax2/5/8. A,B: immagini DIC. C: Immagine in campo scuro che mostra la radializzazione dello scheletro dell'embrione mostrato in B. Le frecce in E e F indicano, rispettivamente, una duplicazione anomala della bacchetta post-orale e una spicola soprannumeraria. L'angolo in basso a destra in E e F, mostra immagini in campo scuro dello scheletro.**

## DISCUSSIONE

La presente ricerca si inserisce nell'ambito di un contesto di studio volto a delucidare la causalità molecolare dei processi chiave dello sviluppo embrionale, focalizzando principalmente l'attenzione sull'analisi funzionale dei geni regolatori responsabili dell'interazione funzionale tra ectoderma e cellule del mesenchima primario. Nell'embrione di riccio di mare geni regolatori multipli codificano per fattori trascrizionali materni e zigotici, molecole di segnalazione paracrina, recettori di membrana e fattori intracellulari che operano in maniera progressiva al fine di generare un complesso programma di sviluppo (Oliveri et al., 2008; Peter and Davidson, 2011). Tra tali regolatori, la famiglia TRIM/RBCC rappresenta una delle maggiori classi di E3 ubiquitina ligasi putative, che svolgono ruoli essenziali in differenti processi cellulari e di sviluppo (Dikic et al., 2009; Jin et al., 2011; Joo et al., 2011; Shen et al., 2011). Non sono presenti, ad oggi, dati in letteratura sui geni codificanti per componenti della famiglia TRIM in *S. purpuratus*.

### **3.1 L'organizzazione genomica di *strim1* e la struttura della proteina putativa riflettono le caratteristiche della famiglia multigenica TRIM/RBCC**

Nel corso dello studio *in silico* descritto è stato identificato, nella specie di riccio di mare *P. lividus*, un *locus* comprendente due copie, probabilmente originatesi da un evento di duplicazione genica, di un gene contenente *trim box*. Ne è stato isolato il cDNA corrispondente e si è, quindi, pervenuti all'isolamento del primo membro della famiglia TRIM in riccio di mare, denominato *strim1*(*sea urchin trim1*). La sequenza amminoacidica di proteine TRIM in *S. purpuratus* mostra un elevato grado di similarità con il corrispondente prodotto proteico in *P. lividus*. La presenza di siti polimorfici, spesso associati a mutazioni sinonime, appare plausibile sulla base dei rapporti evolutivi tra le due specie.

Complessità numerica, diversificazione funzionale e rapidità evolutiva caratterizzanti i geni *trim* hanno reso difficile l'individuazione di un ortologo di *strim1* in *S. purpuratus*. L'estesa e approfondita analisi comparativa condotta ha comunque consentito di caratterizzare l'intero complemento di geni *trim* in quest'ultima specie. Inoltre, i risultati ottenuti, indicanti la presenza di copie geniche multiple, sia in *S. purpuratus* che in *P. lividus*, in regioni genomiche distinte, concordano con le evidenze presenti in letteratura (Sardiello et al., 2008).

Al fine di rendere l'analisi esaustiva è stato avviato lo studio della *cis-regolazione* del gene. Interazioni complesse, che coinvolgono attivatori e repressori ubiquitari e/o tessuto-specifici, delineano il profilo di espressione caratteristico di un gene. Sono noti in letteratura casi in cui elementi di *cis-regolazione* giacciono in sequenze introniche (Zimmerman et al., 1994), regioni 3' non tradotte (Palmer et al., 2007; Yochum et al., 2008) o nella regione codificante (Tümpel et al., 2008), oltre alla localizzazione nella regione del promotore, da poche centinaia di basi a chilobasi di distanza dal promotore basale. Dati in letteratura, inoltre, sottolineano l'importanza dell'analisi comparativa per l'individuazione di elementi putativi di *cis-regolazione* dell'espressione genica, in particolare nel caso di specie evolutivamente distanti, quali *S. purpuratus* e *P. lividus*, sebbene per molti aspetti simili. Mediante un'astrazione speculativa, i risultati ottenuti dall'analisi comparativa tra i promotori dei geni *trim C-V* in *S. purpuratus*, potrebbero collimare con i risultati relativi all'espressione ristretta al solo ectoderma orale di *strim1* di *P. lividus*, ad essi altamente simile nella sequenza codificante. Di fondamentale importanza, ai fini interpretativi, è proprio l'elevato grado di identità riscontrato tra le sequenze codificanti dei geni *trim C-V* in *S. purpuratus* e tra questi e *strim1* di *P. lividus*. Si potrebbe ipotizzare una specializzazione tra le diverse *trim C-V* di riccio mare, basata sulla diversificazione della finestra di espressione temporale o della funzione biochimica, piuttosto che nella tessuto-specificità.

L'identificazione dell'elemento trasponibile *Helitron-N2* nella regione del promotore di entrambe le copie di *strim1* rende plausibile la difficoltà nell'individuare l'ortologo in *S. purpuratus*. Essa assume un'importanza ancora maggiore nel motivare la mancata funzionalità *in vivo* delle costruzioni transgeniche ingegnerizzate. Sono riportati in letteratura casi di inattivazione o espressione non stabile di transgeni contenenti elementi trasponibili (Eike et al., 2005). Gli *Helitrons*, in particolare, rappresentano un'importante classe di trasposoni, identificati in organismi distinti, dai nematodi ai vertebrati superiori, oltre che nelle piante. Il coinvolgimento in eventi di cattura genica rende gli *Helitrons* un importante strumento evolutivo (Jurka et al., 2007; Kapitonov and Jurka, 2007). Eventi di duplicazione, delezione o degenerazione hanno originato, nel corso dell'evoluzione, l'elevata diversificazione che caratterizza la famiglia di geni *trim*, inclusa la specie-specificità funzionale e la presenza di pseudogeni (Han et al., 2011; Sardiello et al., 2008). Ciò appare evidente, inoltre, da un confronto interspecifico tra le sequenze amminoacidiche dei domini costituenti il modulo tripartito di Strim1 di *P. lividus* e delle proteine TRIM ad essa maggiormente simili di organismi differenti

lungo la scala evolutiva. Non sono rari, inoltre, i casi in cui tra i geni duplicati, alcuni paraloghi vengano trasposti in regioni genomiche distinte da quella originaria, in cui subiscono processi di evoluzione adattativa (Cusack and Wolfe, 2007; Han et al., 2009). Una dettagliata analisi a riguardo, per quanto rilevante, comunque, esulava dal presente studio, volto primariamente ad analisi di natura funzionale e all'eventuale individuazione di interconnessioni tra pathways che potrebbe contribuire alla comprensione delle basi molecolari di processi fisiologici durante l'embriogenesi.

### ***3.2 L'espressione specifica di *strim1* in cellule dell'ectoderma orale influenza la morfogenesi scheletrica dell'embrione di riccio di mare***

Esperimenti di QPCR e ISH su embrioni interi hanno consentito di individuare la finestra di espressione temporale e il profilo di distribuzione spaziale dei trascritti *strim1* in *P. lividus*. In particolare allo stadio di gastrula l'espressione appare prevalentemente ristretta ad aree ectodermiche in corrispondenza dei siti di localizzazione simmetrica ventro-laterale dei clusters di PMCs. L'ipotesi che *Strim1* potesse essere coinvolto in interazioni cellulari funzionali tra ectoderma e PMCs, già documentate in letteratura per prodotti genici di diversa natura (Armstrong et al., 1993; Cavalieri et al., 2003; Duloquin et al., 2007), è stata verificata mediante saggi di perturbazione dell'espressione genica. L'espressione ectopica del corrispondente mRNA determina, infatti, una rilevante alterazione della morfogenesi scheletrica. Il fenotipo aberrante appare distinguibile a partire dallo stadio di gastrula precoce, in cui si riscontrano alterazioni nel numero e nell'assetto delle cellule del mesenchima primario. Il posizionamento stereotipato adottato da tali cellule durante la loro migrazione nel blastoceles all'inizio della gastrulazione costituisce la base della morfogenesi dello scheletro embrionale. È pertanto ipotizzabile un ruolo per *strim1* nel controllo del processo di scheletrogenesi, nel contesto di una segnalazione orientata dall'ectoderma alle PMCs.

Analogamente, è stato recentemente individuato in *C. elegans* il ruolo della proteina TRIM18/MADD2 nella regolazione di processi di migrazione orientata durante l'embriogenesi (Alexander et al., 2010). È probabile, inoltre, una potenziale influenza di *strim1* sul processo di divisione cellulare, escludendo la possibilità che l'eccessivo numero di PMCs osservate costituisca un artefatto. Si ipotizza, comunque, che

L'aumento nel numero di PMCs non sia correlato alle aberrazioni scheletriche in embrioni perturbati. È stato, infatti, dimostrato che il trapianto di PMCs in eccesso in embrioni in via di sviluppo non altera la normale morfologia e dimensione dello scheletro embrionale (Armstrong et al., 1993; Ettensohn, 1990). L'espressione di *striml* potrebbe, quindi, avere un ruolo fisiologico nelle specie di riccio di mare in cui le PMCs subiscono l'ultima divisione dopo l'ingressione nel blastocele. Dati in letteratura rendono ipotizzabile che l'interazione tra le PMCs e l'ectoderma embrionale limiti il numero di siti in cui ha luogo la formazione delle spicole e, al contempo, interazioni addizionali, possano regolare il numero di spicole che si originano in tali siti. Diverse linee di evidenza indicano, in particolare, che l'ectoderma influenza aspetti distinti della scheletogenesi, quali la regolazione temporale del processo, velocità di crescita, numero e dimensione finale delle spicole (Armstrong et al., 1993; Ettensohn, 2009; Hardin and Armstrong, 1997). Stimoli regolatori provenienti dai territori ectodermici, infatti possono risultare in effetti funzionali a livello endomesodermico; basti considerare ad esempio il gene *otp* caratterizzato in *P. lividus*, espresso in un numero limitato di cellule ectodermiche e coinvolto nella scheletogenesi (Cavaliere et al., 2003; Di Bernardo et al., 1999). Altro esempio è dato dalla segnalazione tra VEGF-VEGFR che influenza morfologia e dimensioni dell'endoscheletro larvale (Duloquin et al., 2007). Più in dettaglio, nell'embrione di riccio di mare diverse linee di evidenza hanno suggerito la necessità di segnali ectodermici per dirigere la crescita e il profilo di ramificazione delle spicole (Peterson and McClay, 2003). È stato di recente attribuito tale ruolo al pathway di segnalazione FGFA/FGFR, con l'ipotesi che FGFA possa costituire un segnale di regolazione della migrazione delle PMCs. Sono stati identificati alcuni geni bersagli di tale segnalazione, quali i fattori trascrizionali *pea3* e *pax2/5/8* e la molecola di segnalazione *sprouty* nell'ectoderma laterale e SM30 e SM50 nelle PMCs (Röttinger et al., 2008).

Le implicazioni derivanti dalle evidenze sperimentali descritte, ottenute nel corso del presente studio, sono state confermate dai risultati ottenuti circa l'effetto, fenotipico e molecolare, della perdita di funzione di *striml*. Il blocco della traduzione del relativo trascritto, interferisce, infatti, con il corretto profilo di migrazione e con il differenziamento terminale delle PMCs, portando all'assenza di strutture scheletriche nell'embrione perturbato. La presenza, in alcuni casi, di fenotipi intermedi è interpretabile come riflesso di una interferenza soltanto parziale sulla traduzione di



*strim1* endogeno in tali embrioni, data la specificità, verificata mediante esperimenti preliminari, dell'oligonucleotide morfolino antisense utilizzato.

È stato dimostrato che la trascrizione di *pax2/5/8* e la formazione delle spicole sono eventi costantemente correlati all'espressione di *strim1*, essendo entrambi possibili in sua presenza e assenti se la funzione di *Strim1* viene bloccata. Pertanto, *pax2/5/8* è individuabile quale bersaglio molecolare a valle di *strim1* in territorio ectodermico e ciò suggerisce ipotetiche interazioni di quest'ultimo anche con il pathway di FGFA, alla luce dei recenti dati in letteratura a riguardo (Röttinger et al., 2008). Per quanto concerne la localizzazione dei trascritti *fgfA*, in particolare, l'effetto dell'overespressione e della perdita di funzione di *strim1* su di essa appare di entità inferiore rispetto all'effetto sul gene appena descritto, ma di natura specifica. Alla luce dei risultati ottenuti, è ipotizzabile che la segnalazione dipendente da *strim1* e *fgfA* converga nell'attivazione di *pax2/5/8*. In alternativa, potrebbe sussistere una cascata regolativa addizionale in cui *strim1* partecipa alla modulazione dell'espressione di *fgfA*, influenzando, conseguentemente, anche l'espressione di *pax2/5/8*.

Successivamente è stato valutato l'effetto della perdita di funzione di *strim1* sull'espressione di geni PMCs specifici quali *msp130* e *sm30*. Gli esperimenti suddetti hanno consentito di verificare che nei morfanti il complemento di PMCs sia numericamente analogo a quello di embrioni non perturbati al medesimo stadio, sebbene la distribuzione delle cellule del mesenchima primario nel blastocoele sia disorganizzata. Per quanto concerne l'interazione di *strim1* con *sm30*, essa è di natura indiretta, dati i differenti citotipi in cui i due geni risultano espressi. Similmente a quanto riportato per *pax2/5/8*, l'espressione di *sm30* avviene in maniera *strim1*-dipendente. È ben documentato che *sm30* risponde unicamente al controllo locale dell'epitelio ectodermico e alti livelli di trascritti *sm30* sono direttamente correlati alla formazione di rudimenti scheletrici (Ettensohn, 1997; Guss and Ettensohn, 1997). Segnali regolatori dell'espressione del gene sono identificabili nel fattore trascrizionale Otp (Cavalieri et al., 2003), espresso in poche cellule ectodermiche bilateralmente simmetriche e nei ligandi VEGF e FGF-A (Duloquin et al., 2007; Rottinger et al., 2008). Entrambe tali molecole agiscono come segnali a corto-raggio, percepiti e tradotti selettivamente dalle PMCs per promuovere l'espressione di *sm30*.

La specificità di azione di *strim1* è dimostrata dall'effetto dell'iniezione del mRNA corrispondente in embrioni perturbati. Infatti, l'espressione clonale di *strim1* a livello dell'ectoderma è necessaria e sufficiente a riattivare il programma scheletogenico, come

dimostrato dall'espressione di *sm30* nelle PMCs in fase di aggregazione. Tali cellule, inoltre, riprendono la capacità di migrare e dirigersi verso il clone ectodermico esprimente *strim1*, indicando il coinvolgimento di questo nella regolazione della migrazione direzionale delle PMCs. Ciò è in pieno accordo con i dati in letteratura precedentemente citati.

Risultati descritti, di particolare rilevanza, suggeriscono che la trascrizione di *otp* sia strettamente dipendente dall'espressione di *strim1*, essendo notevolmente incrementata o nullificata in seguito, rispettivamente, a over-espressione e perdita di funzione di *strim1*. È probabile, pertanto, che l'effetto della perturbazione *strim1* sull'espressione del gene *sm30* sia espletato, primariamente, alterando l'espressione di *otp* nell'ectoderma. Entrambi, comunque, esercitano un effetto di tipo indiretto sulle sottostanti PMCs.

Per quanto concerne *fgfA* e *vegf*, la loro espressione risulta, rispettivamente, influenzata parzialmente e non influenzata dalla perturbazione di *strim1*. Non si può comunque, escludere, che il fattore Strim1 possa modulare il traffico o la stabilità dei ligandi proteici o altre proteine secrete.

Molecole di varia natura, infatti, possono contribuire al controllo della segnalazione di pathways di trasduzione, e, conseguenzialmente, degli eventi intracellulari a valle, agendo a differenti livelli e inducendo modifiche post-traduzionali. Esempi di segnalazione negativa da recettori a tirosin chinasi coinvolgono l'azione coordinata di ubiquitina ligasi e altre molecole. In tale processo le ubiquitina ligasi appaiono coinvolte in processi di degradazione proteolitica e regolazione trascrizionale (Conaway et al., 2002). Sono noti esempi di ubiquitina ligasi coinvolte nella regolazione del reclutamento e della migrazione degli osteoclasti durante la scheletogenesi nel topo (Chiusaroli et al., 2003). Dati in letteratura sottolineano il ruolo di proteine TRIM durante l'embriogenesi, regolando i processi di proliferazione cellulare, differenziamento e morfogenesi. In *Xenopus laevis* è stato di recente attribuito un ruolo alla proteina TRIM36 nella somitogenesi e nella determinazione dell'asse dorso-ventrale (Cuykendall and Houston, 2009; Yoshigai et al., 2009).

In un contesto di similarità qualitativa del complemento molecolare per la segnalazione intracellulare tra echinodermi e cordati è dunque apparso interessante condurre il presente studio.



## MATERIALI E METODI

### 4.1 Isolamento del cDNA codificante per *Strim1* e analisi in silico

Un cDNA corrispondente all'intera sequenza di *strim1* è stato ottenuto mediante RT-PCR da un campione di RNA totale, estratto da embrioni di *P. lividus* allo stadio di gastrula. Le sequenze oligonucleotidiche utilizzate a tale scopo sono le seguenti: 5'-TCATATAGACTTTTCGTTATGG-3' (forward) e 5'-TATCTAAATTGAATATATAAAGCCT-3' (reverse).

La caratterizzazione del locus *strim1* è stata condotta mediante analisi predittiva *ab initio* con impiego del software Genscan (Burge and Karlin, 1997), integrata da analisi mediante TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/teess>). Quest'ultimo software è stato impiegato in parallelo per la ricerca di siti putativi di *cis*-regolazione nelle regioni non codificanti dei geni di interesse. Gli allineamenti di sequenza sono stati condotti con i software Megablast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e ClustalW (Chenna et al., 2003). I files derivanti dall'allineamento sono stati formattati mediante BioEdit versione 7.0.9.

È stata condotta una ricerca di similarità con proteine note, mediante le varianti di Blast, TblastX, TblastN, Blastp e PSI-Blast, (Altschul et al., 1997) associata all'analisi di domini conservati presenti nel database CDD (conserved domain database) (Marchler-Bauer et al., 2011) utilizzando come *query*, alternativamente, la sequenza del cDNA codificante per *Strim1* o il complemento di proteine TRIM umane. Sono stati presi in considerazione risultati con E\_value prossimi o uguali a zero.

Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate e tradotte mediante il software pDraw32 (<http://www.acaclone.com>). La composizione in domini della proteina in esame è stata indagata più in dettaglio integrando l'impiego di differenti softwares di predizione e databases tra cui SMART (Letunic et al., 2009) (<http://smart.embl-heidelberg.de>), Pfam (Finn et al., 2010) (<http://pfam.sanger.ac.uk>) e COIL versione 2.2 (Lupas, 1996) ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)), per la predizione di regioni *coiled coil*. L'analisi comparativa è stata condotta impiegando i softwares Family relation II (Brown et al., 2005) e Vista (Frazer et al., 2004). Il software Censor (Kohany et al., 2006), implementato sull'algoritmo Wu-Blast, è stato utilizzato per l'identificazione e la visualizzazione grafica della distribuzione di elementi trasponibili e sequenze ripetute sulle sequenze di interesse.

## 4.2 Real-Time PCR Quantitativa

L'RNA totale è stato estratto da uova non fecondate ed embrioni a differenti stadi di sviluppo mediante RNeasy mini kit (Qiagen), seguendo il protocollo indicato. Al fine di eliminare contaminazioni residue di DNA, i campioni di RNA sono stati trattati con DNAsi e purificati mediante estrazione fenolo/cloroformio. La trascrizione inversa in cDNA è stata condotta utilizzando esameri *random* mediante il kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). I risultanti campioni di cDNA sono stati ulteriormente diluiti e 10-20 ng sono stati utilizzati per l'analisi mediante Q-PCR. Sono stati utilizzati oligonucleotidi che consentissero l'amplificazione di prodotti di dimensioni pari a circa 125 bp. Tutte le reazioni di Q-PCR sono state condotte in triplicato su 7300 Real time PCR system (Applied biosystems) utilizzando la chimica SYBR Green (Applied Biosystems). ROX è stato impiegato come misura di fluorescenza aspecifica il mRNA per la citocromo ossidasi (cyt-ox) o per MBF1 (fattore di legame per l'istone H2A), noti essere espressi a livelli costanti durante lo sviluppo, è stato utilizzato per normalizzare tutti i dati, al fine di tener conto di eventuali differenze tra le preparazioni. Al termine della reazione di amplificazione è stata condotta una "analisi della curva di *melting*" per confermare l'omogeneità di tutti i prodotti di Q-PCR. I dati ottenuti mediante Q-PCR sono stati processati mediante il software RQ Study version 1.2.3 (Applied Biosystem), utilizzando il metodo comparativo del Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Di seguito sono riportate le sequenze oligonucleotidiche utilizzate:

Gene bersaglio	Sequenze (5'-3') Forward (F) e Reverse (R)	Lunghezza	Dimensione dell'amplicone
<i>strim1</i>	F: CGATGAATTAAAGAACACCATGAC R: GGTTGTCCAGGCACGCCTTAC	24 21	124
<i>otp</i>	F: CGGCACAACTGAACGAACTGG R: CGAAATACATTAGTGGTCTTCTTG	21 24	172
<i>pax2/5/8</i>	F: CCCGACAAGGACTCTAACCAG R: GCCTCTGACACGACGCTGCT	21 22	138
<i>fgfA</i>	F: TACATTTGAAGTGGTTGGATTTCG R: GCCAGGGACACGCATAAGAAC	24 21	159
<i>vegf</i>	F: ATCACGCACACATAACGACAAC R: CGAAGATAACACAGAGTCCCTATG	22 24	173
<i>sm30</i>	F: CACGGTCACGGTCACGGTCT R: CTACTTGTCTCAGGAACGCAC	20 21	168
<i>gcm</i>	F: GCTCGTAAGAAGCAAGGTGATAA R: TTAGATTGGAACAGGATGACAGTA	23 24	143
<i>papss</i>	F: GCCTGTATTAGTCTTGATTGATTC R: GGGTCTATCTCCTTGTGTGAAT	24 23	120
<i>mbf-1*</i>	F: ATGACACAGCCTGGAGCT R: TACCAAGGAAGTGGGTGT	18 18	102
<i>cyt-ox*</i>	F: GTTGGGGTTAATCTAACATTCTTC R: GAGGGTATAGGCATCTGGATAG	24 22	93

#### 4.3 Ibridazioni in situ su embrioni interi (WMISH)

Le ibridazioni *in situ* su embrioni a diversi stadi di sviluppo sono state condotte, previa fissazione in paraformaldeide 4% in acqua di mare filtrata, utilizzando il protocollo descritto da Lepage (Lepage et al., 1992) con piccole modifiche. È stata effettuata la sintesi di trascritti senso e antisenso marcati con digossigenina, con metodologia “*run off*”, utilizzando Riboprobe® in vitro Transcription System (Promega), a partire da 1 µg del plasmide pGEM contenente il cDNA completo codificante per *strim1*. Trascritti antisenso sono stati sintetizzati anche per *pax2/5/8*, *fgf-A*, *msp130* e *sm30*.

In seguito alla rimozione del fissativo e ad una fase di preibridazione, l'ibridazione con le sonde di interesse è stata condotta per circa 16 ore a 55°C. Successivamente sono stati condotti lavaggi post-ibridazione a stringenza crescente (soluzioni contenenti NaCl, Sodio citrato, 0.1% Tween) alla temperatura di 65°C. La rivelazione è stata effettuata utilizzando un anticorpo coniugato alla fosfatasi alcalina in presenza dei substrati cromogenici NBT-BCIP. Gli esperimenti di doppia ibridazione in situ sono stati eseguiti secondo la procedura descritta in Thisse et al., 2004, con qualche modifica. Gli embrioni sono stati successivamente sottoposti ad osservazione ad un microscopio Leica DM-4500B. Le immagini sono state acquisite mediante camera digitale Leica DC 300F e processate mediante il software Adobe Photoshop CS4. L'intero esperimento è stato eseguito ad uno stereoscopio Leica MZ 95.

#### 4.4 Preparazione di costruzioni promotore-reporter

Le costruzioni promotore-reporter per le analisi di *cis*-regolazione sono state preparate mediante amplificazione e clonaggio. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione di regioni del promotore del gene *strim1* sono riportate di seguito:

Regione bersaglio	Sequenze (5'-3') Forward (F) e Reverse (R)	Lunghezza	Dimensione dell'amplicone
Promotore <i>strim1</i> (2.5)	F: CCCCGGAATTCGGAGCCAAGTAATACATG R: CCCCGAGATCTTAATTCATCGGCCATAACGAAAA	29 34	3,5 Kb; 1,2 Kb
Promotore <i>strim1</i> (1.35)	F: CCCCGGAATTCGATGGGATTAGGGTTTATTG R: CCCCGAGATCTTAATTCATCGGCCATAACGAAAA	32 34	1,35 Kb
Promotore <i>strim1</i> (0.69)	F: CCCCGGAATTCGAGTAGTATGTATCACCATAG R: CCCCGAGATCTTAATTCATCGGCCATAACGAAAA	32 34	0,69 Kb
Promotore <i>strim1</i> (0.3)	F: CCCCGGAATTCGCAAGGTCAATGTCAAGG R: CCCCGAGATCTTAATTCATCGGCCATAACGAAAA	29 34	0,3 Kb
Regione 3'	F: CTTTCTGTACTCCTGACAG R: CTTCTACACCGATTATGAAAT	19 21	2,3 Kb

Le sequenze sottolineate indicano i siti per endonucleasi di restrizione introdotti ai fini del clonaggio molecolare. Parte degli oligonucleotidi sono stati disegnati in regioni caratteristiche della seconda copia del gene *strim1*, data la presenza di siti di assemblaggio non univoco e tratti di sequenza non nota nella regione del promotore putativo della prima copia genica. I frammenti ottenuti di dimensioni pari a 1.35 Kb, 1.2 Kb e 3.5 Kb, 2.3 Kb, 690 bp e 306 bp sono stati opportunamente digeriti e clonati in frame al gene reporter GFP in vettore pHeGFP. Le costruzioni relative sono state denominate, rispettivamente p1.35GFP, p1.2GFP, p3.5GFP, p690GFP e p306GFP. Le costruzioni con la regione 3'UTR sono state denominate rispettivamente p1.35GFP3'spacer e 3'spacer p1.35GFP.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte mediante l'”Elongase Amplification Kit” (invitrogen) e l'impiego di Taq polimerasi (Finnzyme).

#### **4.5 Microiniezioni di mRNAs sintetici e oligonucleotidi morfolino antisenso**

I saggi sono stati condotti previa sintesi in vitro del trascritto da iniettare. Sia gli mRNAs che gli oligonucleotidi morfolino antisenso sono stati risospesi in glicerolo 30% e destrano coniugato a Texas Red è stato aggiunto al fine di selezionare gli embrioni iniettati.

Per gli esperimenti di over-espressione l'intera sequenza del cDNA codificante per *strim1* e *pax2/5/8* è stata clonata nel vettore pCS2+. Il clone ricombinante è stato opportunamente linearizzato, mRNAs cappati sono stati sintetizzati in vitro mediante impiego del kit SP6-mMessage-mMachine Kit (Ambion) e iniettati in zigoti in quantità pari ad 1 pg. La medesima metodologia è stata utilizzata per la sintesi del trascritto 5'*strim1*-GFP.

Gli oligonucleotidi morfolino antisenso per *strim1*, (Mo-*strim1*: 5'-TGGTGTCTTTAATTCATCGGCCAT-3'), e *pax2/5/8* (Mo-*pax2/5/8* 5'-AAGTAGCCCGTCGGTGAAAATCCAT-3') sono stati ottenuti dalla Gene Tools LLC (Philomath, OR). L'oligonucleotide morfolino antisenso controllo, la cui sequenza è la seguente: 5'CTATCCTACCTTGCTTGTAATCGGG 3' è descritto in Cavalieri et. al., 2003). Approssimativamente 2 pl di soluzione contenente Mo-*strim1* o Mo-*pax2/5/8* è stata iniettata in zigoti in concentrazioni finali comprese tra 0.8 e 2.0 mM e 0.5-0.8 mM, rispettivamente. Per ogni esperimento è stato osservato un numero di embrioni superiore a 150 e gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicato e su lotti

differenti di cellule uovo. Embrioni microiniettati allo stadio desiderato sono stati raccolti, disposti su appositi vetrini e osservati ad un microscopio ad epifluorescenza Leica DM-4500B. Immagini DIC, in campo chiaro, a luce polarizzata sono state acquisite con una camera digitale Leica DC 300F e processate mediante il software Adobe Photoshop CS4.



## BIBLIOGRAFIA

- Abdollahi, A., Schwager, C., Kleeff, J., Esposito, I., Domhan, S., Peschke, P., Hauser, K., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., Debus, J. et al.** (2007). Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12890-5.
- Alexander, M., Selman, G., Seetharaman, A., Chan, K. K., D'Souza, S. A., Byrne, A. B. and Roy, P. J.** (2010). MADD-2, a homolog of the Opitz syndrome protein MID1, regulates guidance to the midline through UNC-40 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* **18**, 961-72.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Amore, G., Yavrouian, R. G., Peterson, K. J., Ransick, A., McClay, D. R. and Davidson, E. H.** (2003). Spdeadringer, a sea urchin embryo gene required separately in skeletogenic and oral ectoderm gene regulatory networks. *Dev Biol* **261**, 55-81.
- Andersson, O., Reissmann, E., Jörnvall, H. and Ibáñez, C. F.** (2006). Synergistic interaction between Gdf1 and Nodal during anterior axis development. *Dev Biol* **293**, 370-81.
- Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (2000). Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo. *Dev Biol* **218**, 1-12.
- Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (2003). Patterning the sea urchin embryo: gene regulatory networks, signaling pathways, and cellular interactions. *Curr Top Dev Biol* **53**, 159-98.
- Angerer, L. M., Newman, L. A. and Angerer, R. C.** (2005). SoxB1 downregulation in vegetal lineages of sea urchin embryos is achieved by both transcriptional repression and selective protein turnover. *Development* **132**, 999-1008.
- Angerer, L. M., Oleksyn, D. W., Levine, A. M., Li, X., Klein, W. H. and Angerer, R. C.** (2001). Sea urchin goosecoid function links fate specification along the animal-vegetal and oral-aboral embryonic axes. *Development* **128**, 4393-404.
- Angerer, L. M., Oleksyn, D. W., Logan, C. Y., McClay, D. R., Dale, L. and Angerer, R. C.** (2000). A BMP pathway regulates cell fate allocation along the sea urchin animal-vegetal embryonic axis. *Development* **127**, 1105-14.
- Anstrom, J. A., Chin, J. E., Leaf, D. S., Parks, A. L. and Raff, R. A.** (1987). Localization and expression of msp130, a primary mesenchyme lineage-specific cell surface protein in the sea urchin embryo. *Development* **101**, 255-65.
- Arima, S., Nishiyama, K., Ko, T., Arima, Y., Hakoziaki, Y., Sugihara, K., Koseki, H., Uchijima, Y., Kurihara, Y. and Kurihara, H.** (2011). Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* **138**, 4763-76.
- Armstrong, N., Hardin, J. and McClay, D. R.** (1993). Cell-cell interactions regulate skeleton formation in the sea urchin embryo. *Development* **119**, 833-40.

- Bally-Cuif, L., Goutel, C., Wassef, M., Wurst, W. and Rosa, F.** (2000). Coregulation of anterior and posterior mesendodermal development by a hairy-related transcriptional repressor. *Genes Dev* **14**, 1664-77.
- Beckstead, R. B., Ner, S. S., Hales, K. G., Grigliatti, T. A., Baker, B. S. and Bellen, H. J.** (2005). Bonus, a Drosophila TIF1 homolog, is a chromatin-associated protein that acts as a modifier of position-effect variegation. *Genetics* **169**, 783-94.
- Benson, S., Sucov, H., Stephens, L., Davidson, E. and Wilt, F.** (1987). A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. I. Authentication of the cloned gene and its developmental expression. *Dev Biol* **120**, 499-506.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P. P.** (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 1006-16.
- Berti, C., Messali, S., Ballabio, A., Reymond, A. and Meroni, G.** (2002). TRIM9 is specifically expressed in the embryonic and adult nervous system. *Mech Dev* **113**, 159-62.
- Bertocchini, F., Skromne, I., Wolpert, L. and Stern, C. D.** (2004). Determination of embryonic polarity in a regulative system: evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo. *Development* **131**, 3381-90.
- Bloor, A. J., Kotsopoulou, E., Hayward, P., Champion, B. R. and Green, A. R.** (2005). RFP represses transcriptional activation by bHLH transcription factors. *Oncogene* **24**, 6729-36.
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K. et al.** (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-8.
- Bolouri, H. and Davidson, E. H.** (2010). The gene regulatory network basis of the "community effect," and analysis of a sea urchin embryo example. *Dev Biol* **340**, 170-8.
- Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P. and Fritsch, B.** (2010). Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev Biol* **10**, 89.
- Boudinot, P., van der Aa, L. M., Jouneau, L., Du Pasquier, L., Pontarotti, P., Briolat, V., Benmansour, A. and Levraud, J. P.** (2011). Origin and evolution of TRIM proteins: new insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish. *PLoS One* **6**, e22022.
- Bradham, C. A. and McClay, D. R.** (2006). p38 MAPK is essential for secondary axis specification and patterning in sea urchin embryos. *Development* **133**, 21-32.
- Briggs, E. and Wessel, G. M.** (2006). In the beginning...animal fertilization and sea urchin development. *Dev Biol* **300**, 15-26.
- Brown, C. T.** (2008). Computational approaches to finding and analyzing cis-regulatory elements. *Methods Cell Biol* **87**, 337-65.
- Brown, C. T., Xie, Y., Davidson, E. H. and Cameron, R. A.** (2005). Paircomp, FamilyRelationsII and Cartwheel: tools for interspecific sequence comparison. *BMC Bioinformatics* **6**, 70.

- Burge, C. and Karlin, S.** (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* **268**, 78-94.
- Cameron, R. A., Fraser, S. E., Britten, R. J. and Davidson, E. H.** (1989). The oral-aboral axis of a sea urchin embryo is specified by first cleavage. *Development* **106**, 641-7.
- Cameron, R. A., Fraser, S. E., Britten, R. J. and Davidson, E. H.** (1991). Macromere cell fates during sea urchin development. *Development* **113**, 1085-91.
- Caratozzolo, M. F., Micale, L., Turturo, M. G., Cornacchia, S., Fusco, C., Marzano, F., Augello, B., D'Erchia, A. M., Guerrini, L., Pesole, G. et al.** (2012). TRIM8 modulates p53 activity to dictate cell cycle arrest. *Cell Cycle* **11**.
- Carson, D. D., Farach, M. C., Earles, D. S., Decker, G. L. and Lennarz, W. J.** (1985). A monoclonal antibody inhibits calcium accumulation and skeleton formation in cultured embryonic cells of the sea urchin. *Cell* **41**, 639-48.
- Carthagen, L., Bergamaschi, A., Luna, J. M., David, A., Uchil, P. D., Margottin-Goguet, F., Mothes, W., Hazan, U., Transy, C., Pancino, G. et al.** (2009). Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One* **4**, e4894.
- Cavalieri, V., Di Bernardo, M., Anello, L. and Spinelli, G.** (2008). cis-Regulatory sequences driving the expression of the Hbox12 homeobox-containing gene in the presumptive aboral ectoderm territory of the *Paracentrotus lividus* sea urchin embryo. *Dev Biol* **321**, 455-69.
- Cavalieri, V., Guarcello, R. and Spinelli, G.** (2011). Specific expression of a TRIM-containing factor in ectoderm cells affects the skeletal morphogenetic program of the sea urchin embryo. *Development* **138**, 4279-90.
- Cavalieri, V., Spinelli, G. and Di Bernardo, M.** (2003). Impairing Otp homeodomain function in oral ectoderm cells affects skeletogenesis in sea urchin embryos. *Dev Biol* **262**, 107-18.
- Chasapis, C. T. and Spyroulias, G. A.** (2009). RING finger E3 ubiquitin ligases: structure and drug discovery. *Curr Pharm Des* **15**, 3716-31.
- Cheers, M. S. and Ettensohn, C. A.** (2005). P16 is an essential regulator of skeletogenesis in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **283**, 384-96.
- Chen, C., Ware, S. M., Sato, A., Houston-Hawkins, D. E., Habas, R., Matzuk, M. M., Shen, M. M. and Brown, C. W.** (2006). The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo. *Development* **133**, 319-29.
- Chen, J. H., Luo, Y. J. and Su, Y. H.** (2011). The dynamic gene expression patterns of transcription factors constituting the sea urchin aboral ectoderm gene regulatory network. *Dev Dyn* **240**, 250-60.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. and Thompson, J. D.** (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**, 3497-500.
- Chin, C. S., Chubukov, V., Jolly, E. R., DeRisi, J. and Li, H.** (2008). Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biol* **6**, e146.

- Chiusaroli, R., Sanjay, A., Henriksen, K., Engsig, M. T., Horne, W. C., Gu, H. and Baron, R.** (2003). Deletion of the gene encoding c-Cbl alters the ability of osteoclasts to migrate, delaying resorption and ossification of cartilage during the development of long bones. *Dev Biol* **261**, 537-47.
- Clark, I. B., Muha, V., Klingseisen, A., Leptin, M. and Müller, H. A.** (2011). Fibroblast growth factor signalling controls successive cell behaviours during mesoderm layer formation in *Drosophila*. *Development* **138**, 2705-15.
- Coffman, J. A. and Denegre, J. M.** (2007). Mitochondria, redox signaling and axis specification in metazoan embryos. *Dev. Biol.* **308**, 266-280.
- Coffman, J. A., McCarthy, J. J., Dickey-Sims, C. and Robertson, A. J.** (2004). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo II. Mitochondrial distribution and redox state contribute to establishing polarity in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **273**, 160-71.
- Conaway, R. C., Brower, C. S. and Conaway, J. W.** (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-8.
- Croce, J., Lhomond, G. and Gache, C.** (2003). Coquillet, a sea urchin T-box gene of the Tbx2 subfamily, is expressed asymmetrically along the oral-aboral axis of the embryo and is involved in skeletogenesis. *Mech Dev* **120**, 561-72.
- Croce, J., Range, R., Wu, S. Y., Miranda, E., Lhomond, G., Peng, J. C., Lepage, T. and McClay, D. R.** (2011). Wnt6 activates endoderm in the sea urchin gene regulatory network. *Development* **138**, 3297-306.
- Croce, J. C. and McClay, D. R.** (2010). Dynamics of Delta/Notch signaling on endomesoderm segregation in the sea urchin embryo. *Development* **137**, 83-91.
- Croce, J. C., Wu, S. Y., Byrum, C., Xu, R., Duloquin, L., Wikramanayake, A. H., Gache, C. and McClay, D. R.** (2006). A genome-wide survey of the evolutionarily conserved Wnt pathways in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **300**, 121-31.
- Cusack, B. P. and Wolfe, K. H.** (2007). Not born equal: increased rate asymmetry in relocated and retrotransposed rodent gene duplicates. *Mol Biol Evol* **24**, 679-86.
- Cuykendall, T. N. and Houston, D. W.** (2009). Vegetally localized *Xenopus* trim36 regulates cortical rotation and dorsal axis formation. *Development* **136**, 3057-65.
- Czerny, T., Bouchard, M., Kozmik, Z. and Busslinger, M.** (1997). The characterization of novel Pax genes of the sea urchin and *Drosophila* reveal an ancient evolutionary origin of the Pax2/5/8 subfamily. *Mech Dev* **67**, 179-92.
- Damle, S. and Davidson, E. H.** (2011). Precise cis-regulatory control of spatial and temporal expression of the *alx-1* gene in the skeletogenic lineage of *s. purpuratus*. *Dev Biol* **357**, 505-17.
- Damle, S. S. and Davidson, E. H.** (2012). Synthetic in vivo validation of gene network circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Dan-Sohkawa, M. and Fujisawa, H.** (1980). Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev Biol* **77**, 328-39.
- Daniels, D. L. and Weis, W. I.** (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 364-71.

- Davidson, E. H., Cameron, R. A. and Ransick, A.** (1998). Specification of cell fate in the sea urchin embryo: summary and some proposed mechanisms. *Development* **125**, 3269-90.
- Davidson, E. H. and Erwin, D. H.** (2006). Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* **311**, 796-800.
- Davidson, E. H., Rast, J. P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C. H., Minokawa, T., Amore, G., Hinman, V., Arenas-Mena, C. et al.** (2002). A genomic regulatory network for development. *Science* **295**, 1669-78.
- De Falco, F., Cainarca, S., Andolfi, G., Ferrentino, R., Berti, C., Rodríguez Criado, G., Rittinger, O., Dennis, N., Odent, S., Rastogi, A. et al.** (2003). X-linked Opitz syndrome: novel mutations in the MID1 gene and redefinition of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A* **120A**, 222-8.
- de-Leon, S. B. and Davidson, E. H.** (2010). Information processing at the foxa node of the sea urchin endomesoderm specification network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10103-8.
- Deshais, R. J. and Joazeiro, C. A.** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.
- Di Bernardo, M., Castagnetti, S., Bellomonte, D., Oliveri, P., Melfi, R., Palla, F. and Spinelli, G.** (1999). Spatially restricted expression of PlOtp, a Paracentrotus lividus orthopedia-related homeobox gene, is correlated with oral ectodermal patterning and skeletal morphogenesis in late-cleavage sea urchin embryos. *Development* **126**, 2171-9.
- Di Bernardo, M., Russo, R., Oliveri, P., Melfi, R. and Spinelli, G.** (1995). Homeobox-containing gene transiently expressed in a spatially restricted pattern in the early sea urchin embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8180-4.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-64.
- Dikic, I., Wakatsuki, S. and Walters, K. J.** (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 659-71.
- Duboc, V., Lapraz, F., Saudemont, A., Bessodes, N., Mekpoh, F., Haillot, E., Quirin, M. and Lepage, T.** (2010). Nodal and BMP2/4 pattern the mesoderm and endoderm during development of the sea urchin embryo. *Development* **137**, 223-35.
- Duboc, V. and Lepage, T.** (2008). A conserved role for the nodal signaling pathway in the establishment of dorso-ventral and left-right axes in deuterostomes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **310**, 41-53.
- Duboc, V., Röttinger, E., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2004). Nodal and BMP2/4 signaling organizes the oral-aboral axis of the sea urchin embryo. *Dev Cell* **6**, 397-410.
- Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2005). Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Dev Cell* **9**, 147-58.
- Duloquin, L., Lhomond, G. and Gache, C.** (2007). Localized VEGF signaling from ectoderm to mesenchyme cells controls morphogenesis of the sea urchin embryo skeleton. *Development* **134**, 2293-302.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M. J., Soligo, S., Morsut, L. et al.** (2009).

FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**, 123-35.

**Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M. and Piccolo, S.** (2005). Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* **121**, 87-99.

**Eike, M. C., Mercy, I. S. and Aalen, R. B.** (2005). Transgene silencing may be mediated by aberrant sense promoter sequence transcripts generated from cryptic promoters. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3080-91.

**Eisen, J. S. and Smith, J. C.** (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735-43.

**Erwin, D. H. and Davidson, E. H.** (2002). The last common bilaterian ancestor. *Development* **129**, 3021-32.

**Erwin, D. H. and Davidson, E. H.** (2009). The evolution of hierarchical gene regulatory networks. *Nat Rev Genet* **10**, 141-8.

**Ettensohn, C. A.** (1990). The regulation of primary mesenchyme cell patterning. *Dev Biol* **140**, 261-71.

**Ettensohn, C. A.** (2006). The emergence of pattern in embryogenesis: regulation of beta-catenin localization during early sea urchin development. *Sci STKE* **2006**, pe48.

**Ettensohn, C. A.** (2009). Lessons from a gene regulatory network: echinoderm skeletogenesis provides insights into evolution, plasticity and morphogenesis. *Development* **136**, 11-21.

**Ettensohn, C. A., Guss, K.A., Hodor, P.G., and Malinda, K.M.** (1997). The morphogenesis of the skeletal system of the sea urchin embryo, in: Collier, J.R. (Ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, vol. VII: Progress in Developmental Biology, Oxford & IBH publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, Calcutta. 225-265.

**Ettensohn, C. A., Illies, M. R., Oliveri, P. and De Jong, D. L.** (2003). Alx1, a member of the Cart1/Alx3/Alx4 subfamily of Paired-class homeodomain proteins, is an essential component of the gene network controlling skeletogenic fate specification in the sea urchin embryo. *Development* **130**, 2917-28.

**Ettensohn, C. A., Kitazawa, C., Cheers, M. S., Leonard, J. D. and Sharma, T.** (2007). Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo: alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network. *Development* **134**, 3077-87.

**Ettensohn, C. A. and Sweet, H. C.** (2000). Patterning the early sea urchin embryo. *Curr Top Dev Biol* **50**, 1-44.

**Fantetti, K. N. and Fekete, D. M.** (2011). Members of the BMP, Shh and FGF morphogen families promote chicken statoacoustic ganglion neurite outgrowth and neuron survival in vitro. *Dev Neurobiol*.

**Faunes, F., Sanchez, N., Moreno, M., Olivares, G. H., Lee-Liu, D., Almonacid, L., Slater, A. W., Norambuena, T., Taft, R. J., Mattick, J. S. et al.** (2011). Expression of transposable elements in neural tissues during *Xenopus* development. *PLoS One* **6**, e22569.

- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K. et al.** (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**, D211-22.
- Franquinet, R. and Foucreir, J.** (2004). Atlante di embriologia descrittiva: Edises.
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M. and Dubchak, I.** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **32**, W273-9.
- Freemont, P. S.** (2000). RING for destruction? *Curr Biol* **10**, R84-7.
- Fuchikami, T., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Amemiya, S., Hosomi, T., Watanabe, T., Kurokawa, D., Kataoka, M., Harada, Y., Satoh, N., Kusunoki, S. et al.** (2002). T-brain homologue (HpTb) is involved in the archenteron induction signals of micromere descendant cells in the sea urchin embryo. *Development* **129**, 5205-16.
- Fukuda, K. and Kikuchi, Y.** (2005). Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Dev Growth Differ* **47**, 343-55.
- Gao, F. and Davidson, E. H.** (2008). Transfer of a large gene regulatory apparatus to a new developmental address in echinoid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6091-6.
- George, N. C., Killian, C. E. and Wilt, F. H.** (1991). Characterization and expression of a gene encoding a 30.6-kDa Strongylocentrotus purpuratus spicule matrix protein. *Dev Biol* **147**, 334-42.
- Gilbert, S. F.** (2000). Developmental Biology. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Online version.
- Gilchrist, D. A. and Adelman, K.** (2010). Moonshine illuminates a developmental role for regulated transcription elongation. *Dev Cell* **19**, 9-10.
- Grabbe, C., Husnjak, K. and Dikic, I.** (2011). The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 295-307.
- Gross, J. M., Peterson, R. E., Wu, S. Y. and McClay, D. R.** (2003). LvTbx2/3: a T-box family transcription factor involved in formation of the oral/aboral axis of the sea urchin embryo. *Development* **130**, 1989-99.
- Guss, K. A. and Etensohn, C. A.** (1997). Skeletal morphogenesis in the sea urchin embryo: regulation of primary mesenchyme gene expression and skeletal rod growth by ectoderm-derived cues. *Development* **124**, 1899-908.
- Gustafson, T. and Wolpert, L.** (1999). Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo. Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. *Exp Cell Res* **253**, 288-95.
- Hammell, C. M., Lubin, I., Boag, P. R., Blackwell, T. K. and Ambros, V.** (2009). nhl-2 Modulates microRNA activity in Caenorhabditis elegans. *Cell* **136**, 926-38.
- Han, K., Lou, D. I. and Sawyer, S. L.** (2011). Identification of a Genomic Reservoir for New TRIM Genes in Primate Genomes. *PLoS Genet* **7**, e1002388.
- Han, M. V., Demuth, J. P., McGrath, C. L., Casola, C. and Hahn, M. W.** (2009). Adaptive evolution of young gene duplicates in mammals. *Genome Res* **19**, 859-67.
- Hans, S., Liu, D. and Westerfield, M.** (2004). Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development* **131**, 5091-102.

**Hardin, J. and Armstrong, N.** (1997). Short-range cell-cell signals control ectodermal patterning in the oral region of the sea urchin embryo. *Dev Biol* **182**, 134-49.

**Harkey, M. A., Klueg, K., Sheppard, P. and Raff, R. A.** (1995). Structure, expression, and extracellular targeting of PM27, a skeletal protein associated specifically with growth of the sea urchin larval spicule. *Dev Biol* **168**, 549-66.

**Hatakeyama, S.** (2011). TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 792-804.

**Heasman, J., Kofron, M. and Wylie, C.** (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* **222**, 124-34.

**Hennig, J., Bresell, A., Sandberg, M., Hennig, K. D., Wahren-Herlenius, M., Persson, B. and Sunnerhagen, M.** (2008). The fellowship of the RING: the RING-B-box linker region interacts with the RING in TRIM21/Ro52, contains a native autoantigenic epitope in Sjögren syndrome, and is an integral and conserved region in TRIM proteins. *J Mol Biol* **377**, 431-49.

**Herquel, B., Ouararhni, K., Khetchoumian, K., Ignat, M., Teletin, M., Mark, M., Béchade, G., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianférani, S., Hamiche, A. et al.** (2011). Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8212-7.

**Hicke, L. and Dunn, R.** (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-72.

**Hinman, V. F. and Davidson, E. H.** (2007). Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19404-9.

**Hiratsuka, S., Kataoka, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Morikawa, S., Tanaka, S., Katsuki, M., Maru, Y. and Shibuya, M.** (2005). Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is involved in guidance of VEGF receptor-positive cells to the anterior portion of early embryos. *Mol Cell Biol* **25**, 355-63.

**Ho, M. C., Johnsen, H., Goetz, S. E., Schiller, B. J., Bae, E., Tran, D. A., Shur, A. S., Allen, J. M., Rau, C., Bender, W. et al.** (2009). Functional evolution of cis-regulatory modules at a homeotic gene in *Drosophila*. *PLoS Genet* **5**, e1000709.

**Howard, M. L. and Davidson, E. H.** (2004). cis-Regulatory control circuits in development. *Dev Biol* **271**, 109-18.

**Howard-Ashby, M., Materna, S. C., Brown, C. T., Chen, L., Cameron, R. A. and Davidson, E. H.** (2006). Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **300**, 90-107.

**Inoue, T., Wang, M., Ririe, T. O., Fernandes, J. S. and Sternberg, P. W.** (2005). Transcriptional network underlying *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4972-7.

**Jin, X., Cheng, H., Chen, J. and Zhu, D.** (2011). RNF13: an emerging RING finger ubiquitin ligase important in cell proliferation. *FEBS J* **278**, 78-84.

**Joo, H. M., Kim, J. Y., Jeong, J. B., Seong, K. M., Nam, S. Y., Yang, K. H., Kim, C. S., Kim, H. S., Jeong, M., An, S. et al.** (2011). Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis via degradation of AKT and MDM2. *Eur J Cell Biol* **90**, 420-31.



- Jul-Larsen, A., Grudic, A., Bjerkvig, R. and Bøe, S. O.** (2010). Subcellular distribution of nuclear import-defective isoforms of the promyelocytic leukemia protein. *BMC Mol Biol* **11**, 89.
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohany, O. and Jurka, M. V.** (2007). Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**, 241-59.
- Kadri, S., Hinman, V. F. and Benos, P. V.** (2011). RNA Deep Sequencing Reveals Differential MicroRNA Expression during Development of Sea Urchin and Sea Star. *PLoS One* **6**, e29217.
- Kapitonov, V. V. and J., J.** (2005). Helitron-N2\_SP, a family of nonautonomous Helitrons in the sea urchin genome. In *Repbase Reports*, vol. 5, pp. 395.
- Kapitonov, V. V. and Jurka, J.** (2007). Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends Genet* **23**, 521-9.
- Kapitonov, V. V. and Jurka, J.** (2008). A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat Rev Genet* **9**, 411-2; author reply 414.
- Kawai, T. and Akira, S.** (2011). Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med* **3**, 513-27.
- Kawasaki, K. and Weiss, K. M.** (2006). Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **306**, 295-316.
- Kawasaki, T., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Takeda, K., Akasaka, K. and Shimada, H.** (1999). Lim1 related homeobox gene (HpLim1) expressed in sea urchin embryos. *Dev Growth Differ* **41**, 273-82.
- Keys, D. N., Lewis, D. L., Selegue, J. E., Pearson, B. J., Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Gates, J., Scott, M. P. and Carroll, S. B.** (1999). Recruitment of a hedgehog regulatory circuit in butterfly eyespot evolution. *Science* **283**, 532-4.
- Kimelman, D.** (2006). Mesoderm induction: from caps to chips. *Nat Rev Genet* **7**, 360-72.
- Kitamura, K., Nishimura, Y., Kubotera, N., Higuchi, Y. and Yamaguchi, M.** (2002). Transient activation of the micro1 homeobox gene family in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) micromere. *Dev Genes Evol* **212**, 1-10.
- Koga, H., Matsubara, M., Fujitani, H., Miyamoto, N., Komatsu, M., Kiyomoto, M., Akasaka, K. and Wada, H.** (2010). Functional evolution of Ets in echinoderms with focus on the evolution of echinoderm larval skeletons. *Dev Genes Evol* **220**, 107-15.
- Kohany, O., Gentles, A. J., Hankus, L. and Jurka, J.** (2006). Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics* **7**, 474.
- Koide, T., Hayata, T. and Cho, K. W.** (2005). *Xenopus* as a model system to study transcriptional regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4943-8.
- Kominami, T.** (1988). Determination of dorso-ventral axis in early embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev Biol* **127**, 187-96.

- Kominami, T., Akagawa, M. and Takata, H.** (2006). Subequatorial cytoplasm plays an important role in ectoderm patterning in the sea urchin embryo. *Dev Growth Differ* **48**, 101-15.
- Kominami, T. and Takata, H.** (2003). Specification of secondary mesenchyme-derived cells in relation to the dorso-ventral axis in sea urchin blastulae. *Dev Growth Differ* **45**, 129-42.
- Kominami, T. and Takata, H.** (2004). Gastrulation in the sea urchin embryo: a model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Dev Growth Differ* **46**, 309-26.
- Kubota, Y. and Ito, K.** (2000). Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn* **217**, 170-9.
- Kudryashova, E., Wu, J., Havton, L. A. and Spencer, M. J.** (2009). Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component. *Hum Mol Genet* **18**, 1353-67.
- Kurokawa, D., Kitajima, T., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Amemiya, S., Shimada, H. and Akasaka, K.** (1999). HpEts, an ets-related transcription factor implicated in primary mesenchyme cell differentiation in the sea urchin embryo. *Mech Dev* **80**, 41-52.
- Langdon, Y. G. and Mullins, M. C.** (2011). Maternal and zygotic control of zebrafish dorsoventral axial patterning. *Annu Rev Genet* **45**, 357-77.
- Lapraz, F., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2009). Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. *PLoS Biol* **7**, e1000248.
- Lapraz, F., Röttinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Wu, S. Y., Bradham, C., Loza, M. A., Hibino, T. et al.** (2006). RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* **300**, 132-52.
- Lee, J. J., Calzone, F. J., Britten, R. J., Angerer, R. C. and Davidson, E. H.** (1986). Activation of sea urchin actin genes during embryogenesis. Measurement of transcript accumulation from five different genes in *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Mol Biol* **188**, 173-83.
- Lee, Y. H., Britten, R. J. and Davidson, E. H.** (1999). SM37, a skeletogenic gene of the sea urchin embryo linked to the SM50 gene. *Dev Growth Differ* **41**, 303-12.
- Lepage, T., Sardet, C. and Gache, C.** (1992). Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **150**, 23-32.
- Lerner, M., Corcoran, M., Cepeda, D., Nielsen, M. L., Zubarev, R., Pontén, F., Uhlén, M., Hober, S., Grandér, D. and Sangfelt, O.** (2007). The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD. *Mol Biol Cell* **18**, 1670-82.
- Letunic, I., Doerks, T. and Bork, P.** (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37**, D229-32.
- Levine, M. and Davidson, E. H.** (2005). Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4936-42.
- Lhomond, G., McClay, D. R., Gache, C. and Croce, J. C.** (2012). Frizzled1/2/7 signaling directs  $\beta$ -catenin nuclearisation and initiates endoderm specification in macromeres during sea urchin embryogenesis. *Development* **139**, 816-25.

- Li, P. P., Chen, C., Lee, C. W., Madhavan, R. and Peng, H. B.** (2011). Axonal filopodial asymmetry induced by synaptic target. *Mol Biol Cell* **22**, 2480-90.
- Li, Y., Chin, L. S., Weigel, C. and Li, L.** (2001). Spring, a novel RING finger protein that regulates synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **276**, 40824-33.
- Livi, C. B. and Davidson, E. H.** (2006). Expression and function of blimp1/krox, an alternatively transcribed regulatory gene of the sea urchin endomesoderm network. *Dev Biol* **293**, 513-25.
- Livingston, B. T., Killian, C. E., Wilt, F., Cameron, A., Landrum, M. J., Ermolaeva, O., Sapojnikov, V., Maglott, D. R., Buchanan, A. M. and Etensohn, C. A.** (2006). A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **300**, 335-48.
- Loedige, I. and Filipowicz, W.** (2009). TRIM-NHL proteins take on miRNA regulation. *Cell* **136**, 818-20.
- Logan, C. Y. and McClay, D. R.** (1997). The allocation of early blastomeres to the ectoderm and endoderm is variable in the sea urchin embryo. *Development* **124**, 2213-23.
- Logan, C. Y., Miller, J. R., Ferkowicz, M. J. and McClay, D. R.** (1999). Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* **126**, 345-57.
- Longabaugh, W. J., Davidson, E. H. and Bolouri, H.** (2009). Visualization, documentation, analysis, and communication of large-scale gene regulatory networks. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 363-74.
- Lupas, A.** (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-82.
- Malinda, K. M., Fisher, G. W. and Etensohn, C. A.** (1995). Four-dimensional microscopic analysis of the filopodial behavior of primary mesenchyme cells during gastrulation in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **172**, 552-66.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R. et al.** (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225-9.
- Materna, S. C. and Davidson, E. H.** (2012). A comprehensive analysis of Delta signaling in pre-gastrular sea urchin embryos. *Dev Biol*.
- McCauley, B. S., Weideman, E. P. and Hinman, V. F.** (2010). A conserved gene regulatory network subcircuit drives different developmental fates in the vegetal pole of highly divergent echinoderm embryos. *Dev Biol* **340**, 200-8.
- McClay, D. R.** (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: sea urchins. *Development* **138**, 2639-48.
- McClay, D. R., Armstrong, N. A. and Hardin, J.** (1992). Pattern formation during gastrulation in the sea urchin embryo. *Dev Suppl*, 33-41.
- McClay, D. R. and Logan, C. Y.** (1996). Regulative capacity of the archenteron during gastrulation in the sea urchin. *Development* **122**, 607-16.
- McNab, F. W., Rajsbaum, R., Stoye, J. P. and O'Garra, A.** (2011). Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol* **23**, 46-56.

- Meroni, G. and Diez-Roux, G.** (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* **27**, 1147-57.
- Meyer, M., Gaudieri, S., Rhodes, D. A. and Trowsdale, J.** (2003). Cluster of TRIM genes in the human MHC class I region sharing the B30.2 domain. *Tissue Antigens* **61**, 63-71.
- Minokawa, T., Rast, J. P., Arenas-Mena, C., Franco, C. B. and Davidson, E. H.** (2004). Expression patterns of four different regulatory genes that function during sea urchin development. *Gene Expr Patterns* **4**, 449-56.
- Morsut, L., Yan, K. P., Enzo, E., Aragona, M., Soligo, S. M., Wendling, O., Mark, M., Khetchoumian, K., Bressan, G., Chambon, P. et al.** (2010). Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development* **137**, 2571-8.
- Mrosek, M., Meier, S., Ucurum-Fotiadis, Z., von Castelmur, E., Hedbom, E., Lustig, A., Grzesiek, S., Labeit, D., Labeit, S. and Mayans, O.** (2008). Structural analysis of B-Box 2 from MuRF1: identification of a novel self-association pattern in a RING-like fold. *Biochemistry* **47**, 10722-30.
- Mu, X., Fu, X., Sun, H., Beremand, P. D., Thomas, T. L. and Klein, W. H.** (2005). A gene network downstream of transcription factor Math5 regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate. *Dev Biol* **280**, 467-81.
- Munir, M.** (2010). TRIM proteins: another class of viral victims. *Sci Signal* **3**, jc2.
- Müller, B. and Grossniklaus, U.** (2010). Model organisms--A historical perspective. *J Proteomics* **73**, 2054-63.
- Nagel, M., Tahinci, E., Symes, K. and Winklbauer, R.** (2004). Guidance of mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula requires PDGF signaling. *Development* **131**, 2727-36.
- Nam, J., Su, Y. H., Lee, P. Y., Robertson, A. J., Coffman, J. A. and Davidson, E. H.** (2007). Cis-regulatory control of the nodal gene, initiator of the sea urchin oral ectoderm gene network. *Dev Biol* **306**, 860-9.
- Napolitano, L. M., Jaffray, E. G., Hay, R. T. and Meroni, G.** (2011). Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. *Biochem J* **434**, 309-19.
- Nishimura, Y., Sato, T., Morita, Y., Yamazaki, A., Akasaka, K. and Yamaguchi, M.** (2004). Structure, regulation, and function of micro1 in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev Genes Evol* **214**, 525-36.
- Okazaki, K.** (1975). Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. *Am Zool* **15**, 567-581.
- Oliveri, P., Carrick, D. M. and Davidson, E. H.** (2002). A regulatory gene network that directs micromere specification in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **246**, 209-28.
- Oliveri, P. and Davidson, E. H.** (2004). Gene regulatory network analysis in sea urchin embryos. *Methods Cell Biol* **74**, 775-94.
- Oliveri, P., Davidson, E. H. and McClay, D. R.** (2003). Activation of pmar1 controls specification of micromeres in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **258**, 32-43.
- Oliveri, P., Tu, Q. and Davidson, E. H.** (2008). Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5955-62.

- Oliveri, P., Walton, K. D., Davidson, E. H. and McClay, D. R.** (2006). Repression of mesodermal fate by *foxa*, a key endoderm regulator of the sea urchin embryo. *Development* **133**, 4173-81.
- Ornitz, D. M. and Marie, P. J.** (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* **16**, 1446-65.
- Otim, O., Amore, G., Minokawa, T., McClay, D. R. and Davidson, E. H.** (2004). SpHnf6, a transcription factor that executes multiple functions in sea urchin embryogenesis. *Dev Biol* **273**, 226-43.
- Owraghi, M., Broitman-Maduro, G., Luu, T., Roberson, H. and Maduro, M. F.** (2010). Roles of the Wnt effector POP-1/TCF in the *C. elegans* endomesoderm specification gene network. *Dev Biol* **340**, 209-21.
- Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H. and Morse, H. C.** (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 849-60.
- Pai, L. M., Orsulic, S., Bejsovec, A. and Peifer, M.** (1997). Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in *Drosophila*. *Development* **124**, 2255-66.
- Palmer, M. B., Majumder, P., Green, M. R., Wade, P. A. and Boss, J. M.** (2007). A 3' enhancer controls snail expression in melanoma cells. *Cancer Res* **67**, 6113-20.
- Perera, S., Holt, M. R., Mankoo, B. S. and Gautel, M.** (2011). Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Dev Biol* **351**, 46-61.
- Peter, I. S. and Davidson, E. H.** (2009a). Genomic control of patterning. *Int J Dev Biol* **53**, 707-16.
- Peter, I. S. and Davidson, E. H.** (2009b). Modularity and design principles in the sea urchin embryo gene regulatory network. *FEBS Lett* **583**, 3948-58.
- Peter, I. S. and Davidson, E. H.** (2010). The endoderm gene regulatory network in sea urchin embryos up to mid-blastula stage. *Dev Biol* **340**, 188-99.
- Peter, I. S. and Davidson, E. H.** (2011). A gene regulatory network controlling the embryonic specification of endoderm. *Nature* **474**, 635-9.
- Peterson, R. E. and McClay, D. R.** (2003). Primary mesenchyme cell patterning during the early stages following ingress. *Dev Biol* **254**, 68-78.
- Poustka, A. J., Kühn, A., Groth, D., Weise, V., Yaguchi, S., Burke, R. D., Herwig, R., Lehrach, H. and Panopoulou, G.** (2007). A global view of gene expression in lithium and zinc treated sea urchin embryos: new components of gene regulatory networks. *Genome Biol* **8**, R85.
- Rafiq, K., Cheers, M. S. and Ettensohn, C. A.** (2012). The genomic regulatory control of skeletal morphogenesis in the sea urchin. *Development* **139**, 579-90.
- Range, R., Lapraz, F., Quirin, M., Marro, S., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2007). Cis-regulatory analysis of nodal and maternal control of dorsal-ventral axis formation by Univin, a TGF-beta related to Vg1. *Development* **134**, 3649-64.
- Range, R. and Lepage, T.** (2011). Maternal Oct1/2 is required for Nodal and Vg1/Univin expression during dorsal-ventral axis specification in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **357**, 440-9.

- Range, R. C., Venuti, J. M. and McClay, D. R.** (2005). LvGroucho and nuclear beta-catenin functionally compete for Tcf binding to influence activation of the endomesoderm gene regulatory network in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **279**, 252-67.
- Ransick, A. and Davidson, E. H.** (1993). A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo. *Science* **259**, 1134-8.
- Ransick, A. and Davidson, E. H.** (2006). cis-regulatory processing of Notch signaling input to the sea urchin glial cells missing gene during mesoderm specification. *Dev Biol* **297**, 587-602.
- Ransick, A., Rast, J. P., Minokawa, T., Calestani, C. and Davidson, E. H.** (2002). New early zygotic regulators expressed in endomesoderm of sea urchin embryos discovered by differential array hybridization. *Dev Biol* **246**, 132-47.
- Rast, J. P., Cameron, R. A., Poustka, A. J. and Davidson, E. H.** (2002). brachyury Target genes in the early sea urchin embryo isolated by differential macroarray screening. *Dev Biol* **246**, 191-208.
- Raunich, L., Giudice, G. and Mnnelli, H.** (1998). Biologia dello sviluppo: embriologia generale, molecolare e comparata.
- Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-95.
- Revilla-i-Domingo, R., Oliveri, P. and Davidson, E. H.** (2007). A missing link in the sea urchin embryo gene regulatory network: hesC and the double-negative specification of micromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12383-8.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S. et al.** (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* **20**, 2140-51.
- Rho, H. K. and McClay, D. R.** (2011). The control of foxN2/3 expression in sea urchin embryos and its function in the skeletogenic gene regulatory network. *Development* **138**, 937-45.
- Ribeiro, C., Ebner, A. and Affolter, M.** (2002). In vivo imaging reveals different cellular functions for FGF and Dpp signaling in tracheal branching morphogenesis. *Dev Cell* **2**, 677-83.
- Rizzo, F., Fernandez-Serra, M., Squarzone, P., Archimandritis, A. and Arnone, M. I.** (2006). Identification and developmental expression of the ets gene family in the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Dev Biol* **300**, 35-48.
- Rodaway, A. and Patient, R.** (2001). Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* **105**, 169-72.
- Rottinger, E., Saudemont, A., Duboc, V., Besnardeau, L., McClay, D. and Lepage, T.** (2008). FGF signals guide migration of mesenchymal cells, control skeletal morphogenesis and regulate gastrulation during sea urchin development. *Development* **135**, 353-65.

**Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P. J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P. C., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W. J. et al.** (2011). VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* **70**, 966-78.

**Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D., Simeone, A. and Driever, W.** (2007). Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr Biol* **17**, 873-80.

**Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V. and Furlong, E. E.** (2007). A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **21**, 436-49.

**Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A. and Meroni, G.** (2008). Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol Biol* **8**, 225.

**Saudemont, A., Haillet, E., Mekpoh, F., Bessodes, N., Quirin, M., Lapraz, F., Duboc, V., Röttinger, E., Range, R., Oisel, A. et al.** (2010). Ancestral regulatory circuits governing ectoderm patterning downstream of Nodal and BMP2/4 revealed by gene regulatory network analysis in an echinoderm. *PLoS Genet* **6**, e1001259.

**Schwamborn, J. C., Berezikov, E. and Knoblich, J. A.** (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* **136**, 913-25.

**Sethi, A. J., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2009). Gene regulatory network interactions in sea urchin endomesoderm induction. *PLoS Biol* **7**, e1000029.

**Sethi, A. J., Wikramanayake, R. M., Angerer, R. C., Range, R. C. and Angerer, L. M.** (2012). Sequential signaling crosstalk regulates endomesoderm segregation in sea urchin embryos. *Science* **335**, 590-3.

**Sharma, T. and Etensohn, C. A.** (2010). Activation of the skeletogenic gene regulatory network in the early sea urchin embryo. *Development* **137**, 1149-57.

**Sharma, T. and Etensohn, C. A.** (2011). Regulative deployment of the skeletogenic gene regulatory network during sea urchin development. *Development* **138**, 2581-90.

**Shen, H., Zhao, S. H., Cao, J. H., Li, X. Y. and Fan, B.** (2011). Porcine MuRF2 and MuRF3: molecular cloning, expression and association analysis with muscle production traits. *Mol Biol Rep* **38**, 5115-23.

**Sho, T., Tsukiyama, T., Sato, T., Kondo, T., Cheng, J., Saku, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.** (2011). TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1245-53.

**Short, K. M. and Cox, T. C.** (2006). Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* **281**, 8970-80.

**Siegel, P. M. and Massagué, J.** (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 807-21.

**Simeone, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., Casanova, J., Graziani, F., Acampora, D. and Avantaggiato, V.** (1994). Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron* **13**, 83-101.

**Singh, H., Medina, K. L. and Pongubala, J. M.** (2005). Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4949-53.

- Smith, J. and Davidson, E. H.** (2008). Gene regulatory network subcircuit controlling a dynamic spatial pattern of signaling in the sea urchin embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20089-94.
- Smith, J., Kraemer, E., Liu, H., Theodoris, C. and Davidson, E.** (2008). A spatially dynamic cohort of regulatory genes in the endomesodermal gene network of the sea urchin embryo. *Dev Biol* **313**, 863-75.
- Smith, J., Theodoris, C. and Davidson, E. H.** (2007). A gene regulatory network subcircuit drives a dynamic pattern of gene expression. *Science* **318**, 794-7.
- Sodergren, E. Weinstock, G. M. Davidson, E. H. Cameron, R. A. Gibbs, R. A. Angerer, R. C. Angerer, L. M. Arnone, M. I. Burgess, D. R. Burke, R. D. et al.** (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**, 941-52.
- Song, S., Ge, Q., Wang, J., Chen, H., Tang, S., Bi, J., Li, X., Xie, Q. and Huang, X.** (2011). TRIM-9 functions in the UNC-6/UNC-40 pathway to regulate ventral guidance. *J Genet Genomics* **38**, 1-11.
- Stamateris, R. E., Rafiq, K. and Etensohn, C. A.** (2010). The expression and distribution of Wnt and Wnt receptor mRNAs during early sea urchin development. *Gene Expr Patterns* **10**, 60-4.
- Stathopoulos, A. and Levine, M.** (2005). Genomic regulatory networks and animal development. *Dev Cell* **9**, 449-62.
- Stuart, E. T., Kioussi, C. and Gruss, P.** (1994). Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet* **28**, 219-36.
- Su, Y. H.** (2009). Gene regulatory networks for ectoderm specification in sea urchin embryos. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 261-7.
- Su, Y. H., Li, E., Geiss, G. K., Longabaugh, W. J., Krämer, A. and Davidson, E. H.** (2009). A perturbation model of the gene regulatory network for oral and aboral ectoderm specification in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **329**, 410-21.
- Summers R G, Morrill J B, Leith A, Marko M, Piston D W and T, S. A.** (1993). A stereometric analysis of karyogenesis, cytokinesis, and cell arrangements during and following fourth cleavage period in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, vol. Dev. Growth Diff, pp. 41-58.
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R.** (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* **13**, 1834-46.
- Sweet, H. C., Gehring, M. and Etensohn, C. A.** (2002). LvDelta is a mesoderm-inducing signal in the sea urchin embryo and can endow blastomeres with organizer-like properties. *Development* **129**, 1945-55.
- Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H. and Saijoh, Y.** (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes Dev* **21**, 3272-82.
- Tanji, K., Kamitani, T., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H. and Wakabayashi, K.** (2010). TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* **38**, 210-8.
- Technau, U. and Scholz, C. B.** (2003). Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int J Dev Biol* **47**, 531-9.



- Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J. P. and Thisse, C.** (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol.* **77**, 505-519.
- Tomlinson, C. R. and Klein, W. H.** (1990). Temporal and spatial transcriptional regulation of the aboral ectoderm-specific Spec genes during sea urchin embryogenesis. *Mol Reprod Dev* **25**, 328-38.
- Torres-Padilla, M. E. and Zernicka-Goetz, M.** (2006). Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote. *J Cell Biol* **174**, 329-38.
- Tu, Q., Brown, C. T., Davidson, E. H. and Oliveri, P.** (2006). Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. *Dev Biol* **300**, 49-62.
- Tümpel, S., Cambrero, F., Sims, C., Krumlauf, R. and Wiedemann, L. M.** (2008). A regulatory module embedded in the coding region of Hoxa2 controls expression in rhombomere 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20077-82.
- Valiyeva, F., Jiang, F., Elmaadawi, A., Moussa, M., Yee, S. P., Raptis, L., Izawa, J. I., Yang, B. B., Greenberg, N. M., Wang, F. et al.** (2011). Characterization of the oncogenic activity of the novel TRIM59 gene in mouse cancer models. *Mol Cancer Ther* **10**, 1229-40.
- van der Aa, L. M., Levraud, J. P., Yahmi, M., Lauret, E., Briolat, V., Herbomel, P., Benmansour, A. and Boudinot, P.** (2009). A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish. *BMC Biol* **7**, 7.
- Vonica, A., Weng, W., Gumbiner, B. M. and Venuti, J. M.** (2000). TCF is the nuclear effector of the beta-catenin signal that patterns the sea urchin animal-vegetal axis. *Dev Biol* **217**, 230-43.
- Wang, Q., Uhlirova, M. and Bohmann, D.** (2010). Spatial restriction of FGF signaling by a matrix metalloprotease controls branching morphogenesis. *Dev Cell* **18**, 157-64.
- Wang, W. and Lufkin, T.** (2000). The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* **227**, 432-49.
- Webb, S. E., Lee, K. K., Tang, M. K. and Ede, D. A.** (1997). Fibroblast growth factors 2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells. *Dev Dyn* **209**, 206-16.
- Wei, Z., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2006). A database of mRNA expression patterns for the sea urchin embryo. *Dev Biol* **300**, 476-84.
- Wei, Z., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2011a). Direct development of neurons within foregut endoderm of sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9143-7.
- Wei, Z., Liu, X. and Zhang, H.** (2011b). Identification and Characterization of piRNA-Like Small RNAs in the Gonad of Sea Urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *Mar Biotechnol (NY)*.
- Wei, Z., Yaguchi, J., Yaguchi, S., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2009). The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center. *Development* **136**, 1179-89.
- Weissman, A. M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-78.

- Weissman, A. M., Shabek, N. and Ciechanover, A.** (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 605-20.
- Weitzel, H. E., Illies, M. R., Byrum, C. A., Xu, R., Wikramanayake, A. H. and Etensohn, C. A.** (2004). Differential stability of beta-catenin along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo mediated by dishevelled. *Development* **131**, 2947-56.
- Wessel, G. M. and McClay, D. R.** (1985). Sequential expression of germ-layer specific molecules in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **111**, 451-63.
- Wikramanayake, A. H., Brandhorst, B. P. and Klein, W. H.** (1995). Autonomous and non-autonomous differentiation of ectoderm in different sea urchin species. *Development* **121**, 1497-505.
- Wikramanayake, A. H., Huang, L. and Klein, W. H.** (1998). beta-Catenin is essential for patterning the maternally specified animal-vegetal axis in the sea urchin embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9343-8.
- Wikramanayake, A. H., Peterson, R., Chen, J., Huang, L., Bince, J. M., McClay, D. R. and Klein, W. H.** (2004). Nuclear beta-catenin-dependent Wnt8 signaling in vegetal cells of the early sea urchin embryo regulates gastrulation and differentiation of endoderm and mesodermal cell lineages. *Genesis* **39**, 194-205.
- Wilt, F. H., Killian, C. E., Hamilton, P. and Croker, L.** (2008). The dynamics of secretion during sea urchin embryonic skeleton formation. *Exp Cell Res* **314**, 1744-52.
- Wolpert, L. and Gustafson, T.** (1967). Cell movement and cell contact in sea urchin morphogenesis. *Endeavour* **26**, 85-90.
- Wu, S. Y., Ferkowicz, M. and McClay, D. R.** (2007). Ingression of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo: a precisely timed epithelial mesenchymal transition. *Birth Defects Res C Embryo Today* **81**, 241-52.
- Wu, S. Y. and McClay, D. R.** (2007). The Snail repressor is required for PMC ingression in the sea urchin embryo. *Development* **134**, 1061-70.
- Wulczyn, F. G., Cuevas, E., Franzoni, E. and Rybak, A.** (2011). miRNAs Need a Trim : Regulation of miRNA Activity by Trim-NHL Proteins. *Adv Exp Med Biol* **700**, 85-105.
- Xu, S., Menu, E., De Becker, A., Van Camp, B., Vanderkerken, K. and Van Riet, I.** (2011). Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells are Attracted by Multiple Myeloma Cell-Produced Chemokine CCL25 and Favor Myeloma Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Stem Cells*.
- Yaguchi, S., Nakajima, Y., Wang, D. and Burke, R. D.** (2006). Embryonic expression of engrailed in sea urchins. *Gene Expr Patterns* **6**, 566-71.
- Yaguchi, S., Yaguchi, J., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2008). A Wnt-FoxQ2-nodal pathway links primary and secondary axis specification in sea urchin embryos. *Dev Cell* **14**, 97-107.
- Yaguchi, S., Yaguchi, J., Wei, Z., Jin, Y., Angerer, L. M. and Inaba, K.** (2011). Fez function is required to maintain the size of the animal plate in the sea urchin embryo. *Development* **138**, 4233-43.
- Yajima, M.** (2007). A switch in the cellular basis of skeletogenesis in late-stage sea urchin larvae. *Dev Biol* **307**, 272-81.

- Yamazaki, A., Kawabata, R., Shiomi, K., Amemiya, S., Sawaguchi, M., Mitsunaga-Nakatsubo, K. and Yamaguchi, M.** (2005). The *micro1* gene is necessary and sufficient for micromere differentiation and mid/hindgut-inducing activity in the sea urchin embryo. *Dev Genes Evol* **215**, 450-59.
- Yang, X., Dormann, D., Münsterberg, A. E. and Weijer, C. J.** (2002). Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell* **3**, 425-37.
- Yochum, G. S., Cleland, R. and Goodman, R. H.** (2008). A genome-wide screen for beta-catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls c-Myc gene expression. *Mol Cell Biol* **28**, 7368-79.
- Yoshigai, E., Kawamura, S., Kuhara, S. and Tashiro, K.** (2009). Trim36/Haprin plays a critical role in the arrangement of somites during *Xenopus* embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 428-32.
- Yu, S., Gao, B., Duan, Z., Xu, W. and Xiong, S.** (2011). Identification of tripartite motif-containing 22 (TRIM22) as a novel NF- $\kappa$ B activator. *Biochem Biophys Res Commun* **410**, 247-51.
- Yuh, C. H., Brown, C. T., Livi, C. B., Rowen, L., Clarke, P. J. and Davidson, E. H.** (2002). Patchy interspecific sequence similarities efficiently identify positive cis-regulatory elements in the sea urchin. *Dev Biol* **246**, 148-61.
- Zeitlinger, J., Zinzen, R. P., Stark, A., Kellis, M., Zhang, H., Young, R. A. and Levine, M.** (2007). Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **21**, 385-90.
- Zhang, H., Vutskits, L., Pepper, M. S. and Kiss, J. Z.** (2003). VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* **163**, 1375-84.
- Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G. and McMahon, A.** (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11-24.
- Zito, F., Nakano, E., Sciarrino, S. and Matranga, V.** (2000). Regulative specification of ectoderm in skeleton disrupted sea urchin embryos treated with monoclonal antibody to Pl-nectin. *Dev Growth Differ* **42**, 499-506.

## **RINGRAZIAMENTI**

*A conclusione di questo percorso, al contempo faticoso e interessante, ringrazio il mio Tutor, Prof. Giovanni Spinelli, per avermi dato fiducia, consentendomi di maturare le mie prime esperienze di ricerca nel suo laboratorio, e per avermi mostrato il fascino della Scienza...*

*Ringrazio, inoltre, in modo particolare, il mio co-Tutor, Dott. Vincenzo Cavalieri, che con pazienza, costanza e professionalità mi ha iniziato alla pratica delle tecniche di laboratorio, trasmettendomi nozioni e metodo, ha stimolato la mia curiosità, incoraggiato le mie deduzioni, sostenuto i miei sforzi...*

*Ringrazio, inoltre, la Prof.ssa Ida Albanese per i periodici momenti di confronto e i suoi suggerimenti dettagliati*

*Ringrazio i miei colleghi per aver contribuito a rendere questa esperienza un momento di crescita personale oltre che scientifica e professionale*

*Ringrazio, infine, la mia Famiglia...*